COUNTWAY LIBRARY
HC GEBL

/N-
BERG'S

BOSTON
MEDICAL LIBRARY
8 THE FENWAY

NAUNYN-SCHMIEDEBERGS

ARCHIV

FÜR

EXPERIMENTELLE PATHOLOGIE

UND

PHARMAKOLOGIE

UNTER MITWIRKUNG
DER DEUTSCHEN PHARMAKOLOGISCHEN GESELLSCHAFT

HERAUSGEGEBEN VON

DR. L. HEILMEYER
PROFESSOR DER INNEREN MEDIZIN
FREIBURG i. Br.

DR. W. HEUBNER
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
BERLIN

DR. L. LENDLE
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
GÖTTINGEN

210. BAND

MIT 155 TEXTABBILDUNGEN

BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
SPRINGER-VERLAG
1950

BOSTON
MAR 7 1951
MEDICAL LIBRARY

CATALOGUED
MAR 8 1951
G.G.Q.

Druck der Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH.
Printed in Germany.

Inhalt des 210. Bandes.

Seite

Aszódi, L. s. **E. Varga, K. Kostya, É. Szabó** und **L. Kesztyüs.**

Barton, Helmut s. **Fritz Jung.**

Baumgärtner, F. s. **K. Mechelke** und **A. Guttmann.**

Beickert, Albrecht, Eine Methode zum quantitativen Nachweis von Äthylurethan in Körperflüssigkeiten. Mit 2 Textabbildungen 479

— Über die Affinität des Urethans zu verschiedenen Zellformen des normalen und leukämischen Blutes. Mit 1 Textabbildung 473

Biehler, Wilhelm, Über die Wirkung steigender, überhoher Dauergaben von Veritol (β-[p-Oxyphenyl-]isopropylmethylamin) im Tierversuch 105

Bornmann, Gerhard, Arnold Loeser und **Gerda Meyer,** Über 1, 2, 4-Butantriol, ein Beitrag zur Pharmakologie und Toxikologie mehrwertiger Alkohole. Mit 3 Textabbildungen 361

Druckrey, Hermann, Beiträge zur Pharmakologie cancerogener Substanzen. Versuche mit Anilin. Mit 1 Textabbildung 137

Emmrich, Rolf, und **Karl Wandel,** Veränderungen der Serumproteine nach Benzol- und Röntgenschädigung der Ratte. Mit 7 Textabbildungen. . . . 236

Fischer, Herbert, und **Walter Vogt,** Über die Beziehungen des Darmstoffs zur Substanz „P" II. Mit 2 Textabbildungen 91

Fleckenstein, Albrecht, H. Tippelt und **H. Kroner,** Über die Dehydrasenhemmende Wirkung von Bienengift 380

— s. **Roland Taugner, Maria Taugner** und **Thomas Lohmüller.**

Förster, Werner, Gustav Kuschinsky und **Heinz Lüllmann,** Über adrenolytische Wirkungen von d, l, 1-(4-oxy-phenyl)-1-oxy-2-n-butylaminoaethan. Mit 3 Textabbildungen 23

Gerlich, Norbert, Über die Beeinflussung der Krampferregbarkeit des Zentralnervensystems durch Novocain. Mit 5 Textabbildungen 311

— **Heinz Wiele,** Über den Einfluß des Tagesrhythmus auf den Glykogenansatz in Leber, Herz und Körpermuskulatur nach Invert- und Traubenzuckergaben 98

Guttmann, A. s. **F. Baumgärtner** und **K. Mechelke.**

Haaf, E. s. **J. Pirwitz.**

Hachmeister, Werner, Das Problem der tödlichen Lungenembolie. Mit 5 Textabbildungen 175

Heim, Fritz, Über den Einfluß von Alkoholen auf den enzymatischen Abbau des Tyramins. Mit 6 Textabbildungen. 16

Heilmeyer, Ingeborg und **Ludwig,** Quantitative Bestimmung kleiner Mengen von Benzaldehydthiosemicarbazon und dessen Derivaten (Tb I 698) in Körperflüssigkeiten. Mit 1 Textabbildung 424

Seite

Herr, Franz, und **Johann Perszász,** Eine neue Methode zur Untersuchung der schmerzstillenden Wirkung. Mit 1 Textabbildung 289

— **Johann Perszász,** Über die Wirkung einiger Derivate des Polamidons. Mit 1 Textabbildung 294

Hildebrand, Gerhard, und **Peter Marquardt,** Zur blutdrucksenkenden Wirkung tyrosinasehaltiger Aufarbeitungen. Mit 5 Textabbildungen 444

Höpker, Wilhelm, Über die Durchblutung der Rattenniere bei Polyurie. Mit 3 Textabbildungen 257

Hohensee, Friedrich, Die Blutungszeit und ihre Beeinflussung durch Hämostyptika 165

Holtz, Peter, und **Hans-Joachim Schümann,** Untersuchungen über den Arterenolgehalt tierischer und menschlicher Nebennieren. Mit 7 Textabbildungen 1

Holz, K. s. **Gerh. Piekarski,**

Jung, Fritz, und **Lotteliese Wirth,** Über die Saponinhämolyse. II. Mitteilung. Mit 4 Textabbildungen 328

— **Helmut Barton,** Über die Wirkungen des Eserins und des Prostigmins am isolierten Froschventrikel. Mit 4 Textabbildungen 200

Kadatz, Rudolf, Ein Verfahren zur Untersuchung der Pharmakologie der Schweißdrüsen des Menschen. Mit 1 Textabbildung 159

Kahlfeld, Hansgünter s. **Otto Riesser †.**

Kalow, Werner, Chlorese durch synthetische Mittel. 4. Mitteilung. Mit 4 Textabbildungen 336

Kesztyüs, L. s. **E. Varga, K. Kostya, É. Szabó** und **L. Aszódi.**

Kiese, Manfred, Dankwart Reinwein und **Hans-Dierck Waller,** Kinetik der Hämiglobinbildung. IV. Mitteilung. Die Hämiglobinbildung durch Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol in roten Zellen in vitro. Mit 5 Textabbildungen 393

— **Maria Soetbeer,** Kinetik der Hämiglobinbildung. Mit 4 Textabbildungen . . 305

Koch, O., und **G. Stüttgen,** Klinische und experimentelle Studien zur Thiosemicarbazonwirkung. Mit 4 Textabbildungen 409

Kopf, Rudolf, Arnold Loeser und **Gerda Meyer,** Untersuchungen über die Pharmakologie und Toxikologie mehrwertiger Alkohole (1, 3-Butylenglykol). Mit 2 Textabbildungen 346

Korting, Günter s. **Horst Uebel.**

Kostya, K. s. **E. Varga, É. Szabó, L. Aszódi** und **L. Kesztyüs.**

Kroner, H. s. **Albrecht Fleckenstein** und **H. Tippelt.**

Kuschinsky, Gustav, und **H. Ludewig,** Permeabilitätsänderungen durch Dicumarol unabhängig von Änderungen der Prothrombinzeit. Mit 2 Textabbildungen 404

— s. **Werner Förster** und **Heinz Lüllmann.**

Lendle, L., und **H. H. Schneider,** Über die Verwendungsmöglichkeit des Insektizids Hexachlorcyklohexan als Oxyurenmittel. Mit 2 Textabbildungen 119

Lenke, Dieter, Über die Wirkung insektizider Stoffe auf Molche und Fische . . 389

Locker, A., H. Siedek und **K. H. Spitzy,** Zur Wirkung von Dinitrokresol und Thiouracil auf den Zellstoffwechsel. Mit 3 Textabbildungen 281

Seite

Loeser, Arnold s. **Gerhard Bornmann** und **Gerda Meyer.**

— s. **Rudolf Kopf** und **Gerda Meyer.**

Lohmüller, Thomas s. **Roland Taugner, Maria Taugner** und **Albrecht Fleckenstein.**

Ludewig, H. s. **Gustav Kuschinsky.**

Lüllmann, Heinz, Über die synergistische Wirkung von Barium-Ionen und Acetylcholin. Mit 4 Textabbildungen 111

— s. **Werner Förster** und **Gustav Kuschinsky.**

Marquardt, Peter s. **Gerhard Hildebrand.**

Mechelke, K., F. Baumgärtner und **A. Guttmann,** Über die Änderungen der Anspannungs- und Austreibungszeit sowie der physikalischen Kreislaufgrößen nach Sympatol, Veritol und Ephedrin beim gesunden Menschen. Mit 6 Textabbildungen 317

— **E. Nusser,** Über die Änderungen der Anspannungs- und Austreibungszeit sowie der physikalischen Kreislaufgrößen nach Adrenalin beim gesunden Menschen. Mit 9 Textabbildungen. 265

Meyer, Fr., Zur Pharmakologie des Cers. Mit 4 Textabbildungen. 247

Meyer, Gerda s. **Gerhard Bornmann** und **Arnold Loeser.**

— s. **Rudolf Kopf** und **Arnold Loeser.**

Moser, Peter, Zur Pathologie der roten Blutzelle. Mit 2 Textabbildungen . . . 39

— Zur Wirkung von Nitrit auf rote Blutzellen des Menschen. Mit 4 Textabbildungen 60

— Zur Wirkung von Nitrit auf rote Blutzellen des Menschen. II. Mitteilung. Mit 1 Textabbildung 468

Nusser, E. s. **K. Mechelke.**

Perszász, Johann s. **Franz Herr.**

Piekarski, Gerhard, und **K. Holz,** Über die Wirkung des Kontakt-insecticiden Handelspräparates „Gix" auf Ratten und Mäuse 71

Pirwitz, Joachim, und **E. Haaf,** Adenosintriphosphorsäure als atmungssteigernder Faktor im menschlichen Serum. Mit 6 Textabbildungen. . . . 374

— **G. Scherer,** Über die fermentative Oxydation von Adrenalin im menschlichen Serum. Mit 2 Textabbildungen 209

Reinwein, Dankwart s. **Manfred Kiese** und **Hans-Dierck Waller.**

Reiter, Melchior, Die Hämiglobin-Chloratreaktion. Mit 2 Textabbildungen . . 36

Riesser, Otto †, und **Hansgünter Kahlfeld,** Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf den gegenseitigen Antagonismus von Adrenalin-Andrenochrom und Insulin im Glykogensyntheseversuch am überlebenden isolierten Rattenzwerchfell 437

Ritter, Ulrich, Über Narkosen von Versuchstieren. Mit 2 Textabbildungen. . . 399

Scherer, G. s. **Joachim Pirwitz.**

Schneider, H. H. s. **L. Lendle.**

Schümann, Hans-Joachim s. **Peter Holtz.**

Siedek, H. s. **A. Locker** und **K. H. Spitzy.**

Soetbeer, Maria s. **Manfred Kiese.**

Spitzy, K. H. s. **A. Locker** und **H. Siedek.**

Seite

Stüttgen, Günter, Der Blutserumspiegel des Marfanils nach oraler Verabreichung. Mit 2 Textabbildungen 431

— s. **O. Koch.**

Szabó, É. s. **E. Varga, K. Kostya, L. Aszódi** und **L. Kesztyüs.**

Taugner, Maria s. **Roland Taugner, Thomas Lohmüller** und **Albrecht Fleckenstein.**

— **Roland, Maria Taugner, Thomas Lohmüller** und **Albrecht Fleckenstein,** Über die Ursache der Muskeladynamie bei Nebennierenrinden-Insuffizienz. Mit 7 Textabbildungen 219

Tippelt, H. s. **Albrecht Fleckenstein** und **H. Kroner.**

Uebel, Horst, Über unterschiedliche östrogene Wachstums-Wirkungen wäßriger Extrakte aus Frisch- und Filatov-Plazenta. Mit 2 Textabbildungen . . . 458

Uebel, Horst, und **Günter Korting,** Über Histaminwirkungen am Modell der Selyeschen Formalin-Arthritis. Mit 4 Textabbildungen 451

Varga, E., K. Kostya, É. Szabó, L. Aszódi und **L. Kesztyüs,** Phosphorylierung im denervierten Muskel 214

Vogt, Walther, Über die Beziehung des Darmstoffs zur Substanz „P" I. Mit 4 Textabbildungen 31

— s. **Herbert Fischer.**

Waller, Hans-Dierck s. **Manfred Kiese** und **Dankwart Reinwein.**

Wandel, Karl s. **Rolf Emmrich.**

Wiele, Heinz s. **Norbert Gerlich.**

Wirth, Lotteliese s. **Fritz Jung.**

Zipf, Hans Friedrich, Die Beeinflussung des Bezold-Jarisch-Reflexes durch zentralwirksame Analeptika und Symphaticomimetika. Mit 6 Textabbildungen 49

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 1—15 (1950).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Rostock
(Direktor: Prof. Dr. med. Peter Holtz).

Untersuchungen über den Arterenolgehalt tierischer und menschlicher Nebennieren.

Von
Peter Holtz und Hans-Joachim Schümann.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 20. September 1949.)

In mehreren Arbeiten[1] der letzten Zeit haben wir Belege dafür erbracht, daß im Nebennierenmark neben *Adrenalin* die entsprechende entmethylierte Verbindung — *Nor-Adrenalin* oder *Arterenol* — in größerer Menge vorhanden ist.

Die von uns zur *Differenzierung* zwischen Adrenalin und Arterenol angewandten *Methoden* machten von folgenden pharmakologischen Eigenschaften Gebrauch, durch die Arterenol sich von Adrenalin unterscheidet: 1. Die *pressorische* Wirkung des Arterenols an der *Katze* wird durch *Ergotoxin, Dihydroergotamin* oder *Yohimbin* nur abgeschwächt, nicht umgekehrt[2]. 2. Die *glykämische* Wirkung des Arterenols am Kaninchen ist (bei l-Arterenol) 10mal bzw. (bei dl-Arterenol) 20mal schwächer als diejenige des Adrenalins[3]. 3. Die blutdrucksteigernde Wirkung des *Arterenols* ist am *Meerschweinchen* und *Kaninchen* (bei l-Arterenol) 2,5mal bzw. (bei dl-Arterenol) 5mal schwächer als die *Adrenalin*wirkung[4].

Die Ergebnisse mit der Methode 1 waren wenig eindrucksvoll, da auch Adrenalin-Arterenolgemische von einer Zusammensetzung, wie sie vermutlich in Nebennierenextrakten vorliegt, — ähnlich wie reines Adrenalin, nur schwächer ausgeprägt — durch *Ergotoxin* eine Umkehr ihrer *pressorischen* in eine *depressorische* Wirkung erfahren. Die im Vergleich mit Adrenalin schwächere *glykämische* und an Kaninchen und Meerschweinchen schwächere pressorische Wirkung von Nebennierenextrakten, die am Katzenblutdruck gegen Adrenalin ausgetestet worden waren, ist nicht unbedingt beweisend für das Vorhandensein von *Arterenol* im Extrakt, da z. B. *Oxytyramin*, in dem nach unserer Auffassung[5] ein obligates Intermediärprodukt der im Nebennierenmark erfolgenden Adrenalinsynthese zu erblicken ist, in der gleichen Richtung liegende Effekte geben würde. Wenn wir[4] auch durch Versuche mit *Hormonkristallisaten* aus Nebennierenmark die Anwesenheit von *Oxytyramin* in wirksamer Konzentration ausschließen konnten, so erschien es doch wünschenswert, die bisherigen Ergebnisse durch Versuche an einem Testobjekt, das eine möglichst *spezifische* Differenzierung zwischen Adrenalin und Arterenol erlaubte, zu stützen. Als solches hatte sich uns[6] in

mehreren voraufgegangenen Arbeiten der einige Tage gelagerte Kaninchendarm erwiesen, der durch die Lagerung seine Ansprechbarkeit auf *Adrenalin* und *Oxytyramin* weitgehend einbüßt, die auf *Arterenol* hingegen behält.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die bisher nur mit *Schweine-* und *Rinder*nebennierenextrakten erhaltenen Resultate durch Versuche mit Nebennieren anderer Tierarten auf eine breitere Basis zu stellen, bzw. zu untersuchen, ob die für *Schwein* und *Rind* gefundenen Verhältnisse auch für andere Tierarten und für den *Menschen* zutreffen.

Methodik.

1. *Extraktherstellung.* Die Nebennierenextrakte wurden wie in den früheren Arbeiten[1] nach dem von FROWEIN[7] angegebenen Verfahren hergestellt. Z. B. werden 2 g Nebennieren mit 10 cm³ n/10 HCl verrieben und nach Zusatz von 30 cm³ aqu. dest. zum Sieden erhitzt. Nach Zugabe von 3,2 cm³ 10%iger Na-Azetatlösung wird nochmals aufgekocht. Hierauf wird zentrifugiert und die überstehende klare Lösung mit NaOH annähernd neutralisiert.

2. *Austestung.* Die Extrakte wurden gegen *Adrenalin* und *Arterenol* zunächst am *Katzenblutdruck* ausgewertet. Die Versuchstiere waren mit Pernocton (0,7 bis 0,8 cm³/kg intramuskulär) narkotisiert und erhielten ½ Std vor Versuchsbeginn 1 mg/kg *Atropin sulfur.* und 6—8 mg/kg *Kokain. hydrochl.* intramuskulär.

Blutdruckäquivalente Mengen *Nebennierenextrakt, Adrenalin* und *Arterenol* wurden dann am *frischen Kaninchendarm* auf ihre Wirksamkeit untersucht. Der Kaninchendarm befand sich in einem mit 20 cm³ Tyrodelösung gefüllten Versuchsgefäß.

Nebennierenextrakt, Adrenalin und *Arterenol* wurden sodann in Dosierungen, die sich am *frischen* Darm als gleichwirksam erwiesen hatten, am 3—5 Tage auf Eis *gelagerten* Darm zur Einwirkung gebracht.* In manchen Versuchen wurde die Wirkung der Extrakte gegen *Adrenalin-Arterenolgemische* ausgetestet, um einen Anhaltspunkt zu gewinnen für die Abschätzung des *Mengenverhältnisses*, in dem Adrenalin und Arterenol in ihnen vorhanden war.

Ergebnisse.

1. Extrakte aus Schweine-, Rinder- und Katzennebennieren.

a) *Schweinenebenniere. Kokain.* Es ist bekannt, daß die blutdrucksteigernde Wirkung des *Adrenalins* durch Vorbehandlung des Versuchstieres mit *Kokain* verstärkt wird: Versuche, über die H. J. SCHÜMANN[6] in der voraufgehenden Arbeit berichtete, hatten ergeben, daß Arterenol von diesem durch Kokain verursachten Sensibilisierungseffekt in den meisten Fällen deutlich stärker betroffen wird als Adrenalin, so daß eine Arterenoldosis, die *vor* Kokain mit Adrenalin gleichwirksam war, sich *nach* Kokain als wirksamer erweist. Wenn das Nebennierenmark neben *Adrenalin* größere Mengen *Arterenol* enthielt, war zu erwarten, daß die pressorische Wirkung von Nebennierenextrakten durch Kokain eine stärkere Potenzierung erführe als die Wirkung reiner Adrenalinlösungen.

* Nähere methodische Angaben finden sich in der Arbeit H. J. SCHÜMANN: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 340 (1950).

In dem Versuch der Abb. 1a waren 0,4 cm³ eines nach FROWEIN (siehe Methodik) hergestellten Extraktes aus *Schweinenebennieren* am Katzenblutdruck ungefähr so wirksam wie 10 γ *Adrenalin*. Nach Kokain (Abb. 1b) ist der Extrakt deutlich wirksamer als die ihm vorher äquivalente Adrenalindosis: Die Wirksamkeit von 0,4 cm³ Extrakt entspricht jetzt nicht mehr 10 γ, sondern 14 γ Adrenalin (Extrakt und Adrenalin wurden nach Kokain nur in halber Dosis injiziert: 0,2 cm³ Extrakt = 7 γ Adrenalin).

Blutdruck- und Darmwirkung. Es ist bekannt, daß *Arterenol* an glattmuskeligen Organen wie z. B. *Uterus* und *Darm* eine schwächere inhibitorische Wirkung besitzt als Adrenalin. In eigenen Versuchen[6] hatte sich

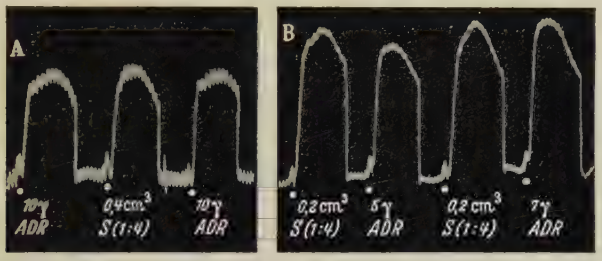


Abb. 1. *Einfluß des Kokains auf die pressorische Wirkung von Adrenalin und Nebennierenextrakt. Katze 2, 1 kg.* A: Vor Kokain. B: Nach Kokain. ADR = Adrenalin. S = Extrakt aus Schweinenebennieren, 4fach verdünnt. *Ergebnis: Kokain* sensibilisiert den Katzenblutdruck stärker für Nebennierenextrakt als für Adrenalin. Das spricht für das Vorhandensein von *Arterenol* neben Adrenalin im Extrakt, da die pressorische Wirkung des Arterenols durch Kokain mehr verstärkt wirkt als diejenige des Adrenalins.

gezeigt, daß die Hemmungswirkung des l-Arterenols am isolierten *Kaninchendarm* nur halb so groß ist wie diejenige des l-Adrenalins; dl-Arterenol ist 4mal weniger wirksam als Adrenalin. Ein auf das 40fache verdünnter Nebennierenextrakt wird am *Blutdruck* der kokainisierten Katze gegen Adrenalin ausgetestet: 0,3 cm³ Extrakt entsprechen 2,5 γ Adrenalin (Abb. 2a). In der Abb. 2b wirken beide — Adrenalin und Extrakt — in zwar 10fach niedrigerer, aber blutdruckäquivalenter Dosierung auf den isolierten *Kaninchendarm* ein: der Extrakt ist deutlich *schwächer* wirksam als Adrenalin. Die Wirksamkeit des Extraktes kann deshalb nicht nur durch Adrenalin verursacht sein, sie könnte auf dem Vorhandensein eines Adrenalin-Arterenolgemisches beruhen.

Bei der in C vorgenommenen *Auswertung* ergibt sich, daß zur Erzielung ungefähr gleichstarker Hemmungswirkungen die in B angewandte Adrenalinmenge (0,25 γ) nur auf das *Doppelte*, nämlich auf 0,5 γ, die Konzentration des Extraktes aber auf das *Vierfache*, nämlich von 1 : 400 auf 1 : 100 erhöht werden muß. Die Extraktkonzentration, die am *Blutdruck* mit einer bestimmten Adrenalinmenge gleich wirksam war, ist am *Darm* nur halb so wirksam wie diese.

Eine Berechnung des *Mengenverhältnisses*, in dem *Adrenalin* und *Arterenol* im Nebennierenextrakt vorliegen, ist auf der Grundlage folgender Überlegung möglich. *l-Arterenol* ist, wie sich immer wieder in unseren Versuchen bestätigte, am Kaninchendarm nur halb so wirksam wie *l-Adrenalin*. Der Nebennierenextrakt *ist* — in blutdruckäquivalenter Dosierung — am *Darm* nur halb so wirksam wie Adrenalin: am *Blutdruck*, entsprechen 0,3 cm³ Extrakt 1 : 40 der Adrenalinmenge von 2,5 γ (A); am *Darm* darf der Extrakt nur auf das 2½fache verdünnt werden — von

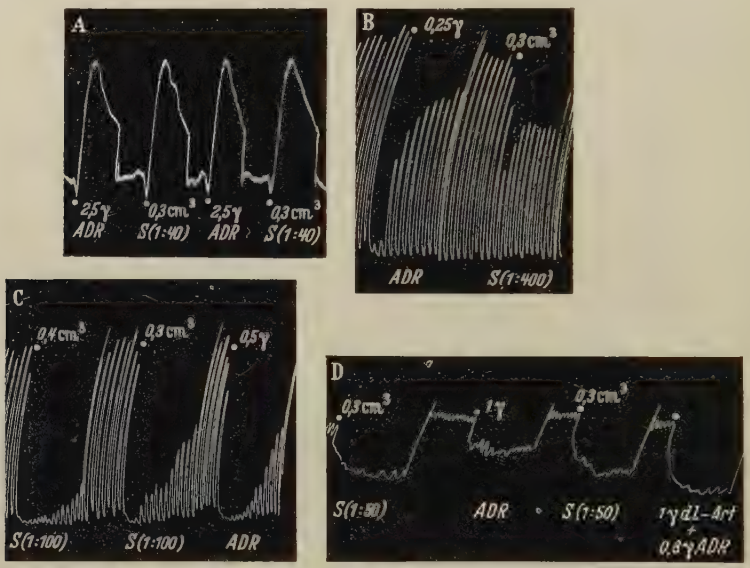


Abb. 2. *Auswertung eines Schweinenebennierenextraktes gegen Adrenalin und Arterenol am Katzenblutdruck und am Kaninchendarm.* A. *Katzenblutdruck:* 0,3 cm³ Extrakt (S) ist gleichwirksam mit 2,5 γ Adrenalin (ADR). B. *Frisches Kaninchenileum:* Eine blutdruckäquivalente Extraktmenge wirkt am Darm schwächer als Adrenalin. (Dosierung in B 10fach niedriger als in A.) C. *Frisches Kaninchenileum:* 0,3 cm³ Extrakt 1 : 100 = 0,5 γ Adrenalin, d. h. die am Blutdruck in A mit Adrenalin äquivalente Extraktkonzentration ist am Darm in C nur halb so wirksam wie Adrenalin (der Extrakt darf im Vergleich zu A nur 2½fach, Adrenalin dagegen 5fach niedriger dosiert werden, um die gleiche Wirkung zu erzielen). D. *5 Tage gelagertes Kaninchenileum:* Doppelt hohe Dosierungen wie in C. Die am *frischen* Darm mit Adrenalin äquivalente Extraktmenge ist am *gelagerten* Darm wirksamer. (Für die *Berechnung* des Adrenalin- und Arterenolgehaltes siehe Text.)

1 : 40 auf 1 : 100 — um mit der 5fach geringeren Adrenalindosis — 0,5 γ anstatt 2,5 γ — gleichwirksam zu bleiben (C). Die am *Darm* um 50% schwächere Wirkung des Extraktes könnte deshalb dadurch bedingt sein, daß er in 0,3 cm³ 1 : 40 nicht 2,5 γ *Adrenalin*, sondern 2,5 γ *l-Arterenol* enthielte, — unter der Voraussetzung, daß die Blutdruckwirksamkeit des *Arterenols* mit derjenigen des *Adrenalins* übereinstimmt. Diese Voraussetzung trifft aber nicht zu. Denn Arterenol ist — besonders nach Kokain — stärker wirksam als Adrenalin. Im vorliegenden Versuch war, wie die hier nicht abgebildete Auswertung ergeben hatte, l-Arterenol

3mal blutdruckwirksamer als l-Adrenalin. Der Extrakt muß deshalb in 0,3 cm³ 1 : 40, die am *Blutdruck* 2,5 γ Adrenalin äquivalent waren und am *Darm* 1,25 γ Adrenalin äquivalent gewesen wären, 1 γ *l-Adrenalin* und 0,5 γ *l-Arterenol* enthalten: 1 γ Adrenalin wird dann am *Blutdruck* bei der 3fach *stärkeren* Wirksamkeit des Arterenols wirkungsmäßig zu 2,5 γ Adrenalin, am *Darm* bei der hier 2fach *schwächeren* Wirksamkeit des Arterenols wirkungsmäßig zu 1,25 γ Adrenalin komplettiert. Der Schweinenebennierenextrakt mußte deshalb 66% *l-Adrenalin* und 33% *l-Arterenol* enthalten.

Das „Experimentum crucis" wird durch den Versuch D in der Abb. 2 am *gelagerten* Darm dargestellt, an dem umgekehrt wie am *frischen* Darm Arterenol stärker wirkt als Adrenalin, und an dem deshalb der arterenolhaltige Extrakt wirksamer ist als die Adrenalinmenge, mit deren Wirkung er am frischen Darm übereinstimmte: 0,3 cm³ Extrakt („S 1 : 50") — die doppelte Menge wie in C — ist in D deutlich wirksamer als 1 γ Adrenalin, das ebenfalls doppelt so hoch dosiert wurde wie in C. — Nach der oben durchgeführten Berechnung beruht die Wirkung des Nebennierenextraktes zu zwei Drittel auf Adrenalin, zu ein Drittel auf Arterenol. 0,3 cm³ Extrakt 1 : 40, die in A die gleiche pressorische Wirkung hatten wie 2,5 γ Adrenalin, würden demnach bei der 3fach stärkeren Blutdruckwirksamkeit des Arterenols 1 γ Adrenalin und 0,5 γ l-Arterenol enthalten. 0,3 cm³ Extrakt 1 : 50, die in D dem gelagerten Darm zugesetzt wurden, würden am Blutdruck 2 γ Adrenalin entsprechen, jedoch ein Gemisch von 0,8 γ Adrenalin + 0,4 γ l-Arterenol enthalten müssen. Dieses Gemisch sollte sich deshalb auch am gelagerten Darm als mit 0,3 cm³ Extrakt 1 : 50 gleichwirksam erweisen. Leider enthielt das für den Versuch D von uns hergestellte Gemisch etwas zu viel Arterenol — anstatt 0,4 γ l- oder 0,8 γ dl-Arterenol hatten wir 1 γ dl-, d. h. 0,5 γ l-Arterenol zugesetzt —, so daß die Wirkung des künstlich hergestellten Gemisches etwas stärker ist als diejenige des im Extrakt vorliegenden.

b) *Rindernebenniere.* Versuche mit Extrakten aus *Rindernebennieren* hatten ähnliche Ergebnisse. In der Abb. 3a wird ein 100fach verdünnter Extrakt aus *Rindernebennieren* am *Blutdruck* der kokainisierten Katze gegen Adrenalin ausgewertet: 0,5 cm³ Extrakt sind mindestens ebenso wirksam wie 1,5 γ Adrenalin. Hierauf werden Extrakt und Adrenalin in 10fach niedrigerer, aber blutdruckäquivalenter Dosierung am *frischen Kaninchendarm* untersucht (Abb. 3b). Der Extrakt (0,5 cm³ 1 : 1000) ist jetzt deutlich weniger wirksam als Adrenalin (0,15 γ). Schon die halbe Adrenalindosis (0,075 γ) genügt, um eine annähernd gleichstarke Hemmung zu erzielen. In C wirken Extrakt und Adrenalin im gleichen Mengen*verhältnis* wie am *frischen* Darm, jedoch in 20fach höherer Dosierung auf den gelagerten Darm ein: der Extrakt ist deutlich wirksamer als die entsprechende Adrenalinmenge.

Dieser Adrenalinmenge — 1,5 γ — würden am *frischen* Darm 3 γ l-Arterenol, das hier nur halb so wirksam ist, entsprochen haben. Am *gelagerten* Darm, der weit empfindlicher auf Arterenol als auf Adrenalin reagiert, hat schon die Hälfte dieser Dosis — 1,5 γ l-Arterenol —, wie die 1. Injektion in der Abb. 3 C zeigt, eine stärkere Wirkung als 1,5 γ Adrenalin. Der *Berechnung* des im Extrakt vorliegenden Mengenverhältnisses von Adrenalin und Arterenol muß wiederum die *Blutdruckwirkung*

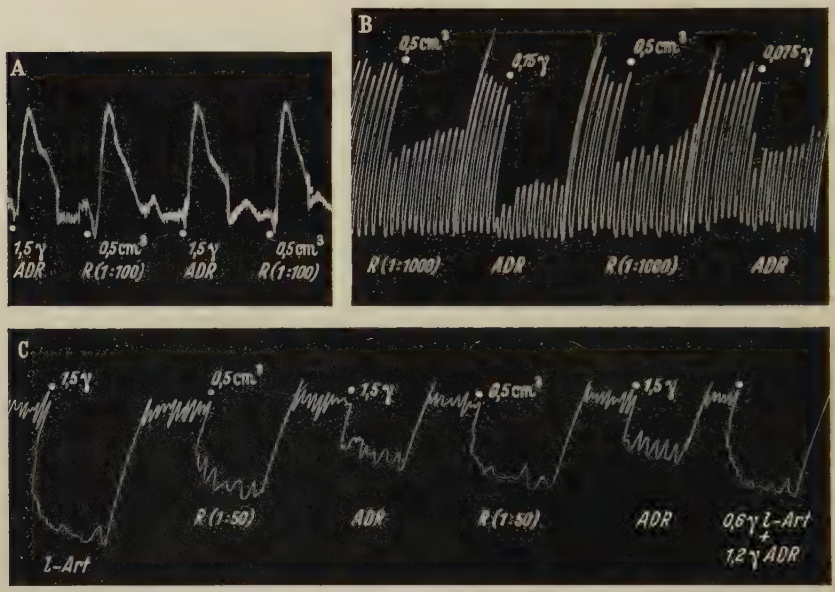


Abb. 3. *Auswertung eines Rindernebennierenextraktes am Blutdruck und Darm.* A: Katzenblutdruck. B: Frischer Kaninchendarm. C: 5 Tage gelagerter Darm. (Nähere Erläuterung und Berechnung im Text.) ADR = Adrenalin. R = Extrakt aus Rindernebenniere. l-Art = l-Arterenol.

zugrundegelegt werden: Auch in diesem Versuch wirkte l-Arterenol an der kokainisierten Katze 3mal stärker als l-Adrenalin. Wenn die in A mit 1,5 γ Adrenalin gleichwirksamen 0,5 cm³ Extrakt 0,6 γ Adrenalin und 0,3 γ l-Arterenol enthielten, so würden am *Blutdruck* bei der hier 3fach stärkeren Arterenolwirkung 0,6 γ Adrenalin durch 0,3 γ l-Arterenol wirkungsmäßig zu 1,5 γ Adrenalin (0,6 γ+0,9 γ), am *frischen Darm* bei der hier nur halb so starken Wirksamkeit des Arterenols 0,6 γ Adrenalin durch 0,3 γ l-Arterenol zu 0,75 γ Adrenalin (0,6 γ + 0,15 γ) komplettiert werden, und schließlich müßte am *gelagerten Darm* die Applikation des berechneten Mischungsverhältnisses — 0,6 γ Adrenalin + 0,3 γ l-Arterenol — die gleiche Wirkung haben wie der Extrakt. Dieser wurde in C in doppelt so hoher Dosierung wie in A (Blutdruck) gegeben — nicht 100-fach, sondern nur 50fach verdünnt — und stimmt in seiner darmhem-

menden Wirkung mit dem ebenfalls doppelt hoch dosierten Adrenalin-Arterenolgemisch — 1,2 γ Adrenalin + 0,6 γ l-Arterenol — überein.

Auch für *Rindernebennieren* ergibt deshalb die auf Grund der am *Blutdruck* und am *Darm* erhaltenen Versuchsergebnisse durchgeführte Berechnung das Verhältnis zwei Drittel Adrenalin und ein Drittel Arterenol.

c) *Katzennebenniere.* Auch Katzennebennierenextrakte, am *Blutdruck* gegen Adrenalin ausgetestet, anschließend am *frischen* und *gelagerten Kaninchendarm* untersucht, verhielten sich wie Adrenalin-Arterenolgemische. Die Abb. 4 zeigt nur das Ergebnis eines Versuches am Blutdruck der Katze und am *frischen* Kaninchendarm. Im Darmversuch wurden Adrenalin und Extrakt in 3mal niedrigerer Dosierung als im Blutdruckversuch gegeben. Auch hier zeigte sich wieder, daß die mit Adrenalin *pressorisch* mindestens gleichwirksame Extraktmenge am *Darm* nur halb so wirksam ist (Abb. 4b).

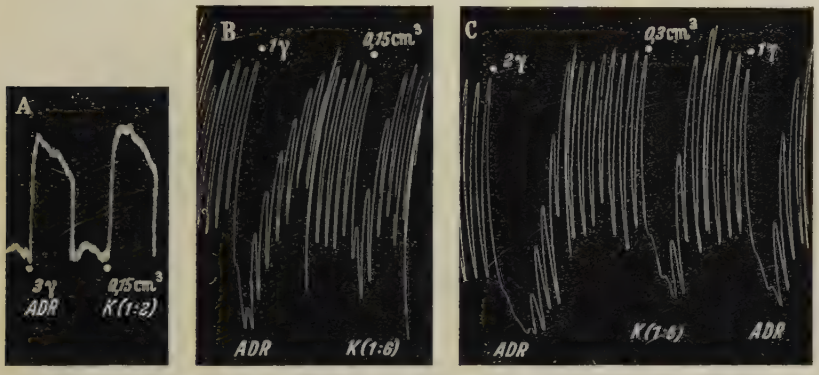


Abb. 4. *Blutdruck- und Darmwirkung eines Extraktes aus Katzennebenniere im Vergleich mit Adrenalin. A:* Katzenblutdruck. *Katze 2,7 kg.* Pernoctonnarkose. Atropin sulfur. 1 mg/kg; Kokain. hydrochl. 8 mg/kg intramuskulär. *B. u. C:* Frischer Kaninchendarm. ADR = Adrenalin. K = Extrakt aus Katzennebenniere. Auch Katzennebennierenextrakte sind am Darm schwächer wirksam (B) als blutdruckäquivalente Adrenalinmengen (A). Die Austestung (C) ergibt am Darm nur die halbe Wirksamkeit.

2. Nebennierenextrakte von Kaninchen und Meerschweinchen.

Im Gegensatz zu den bisherigen Versuchsergebnissen ließ sich in Nebennierenextrakten von *Kaninchen* und *Meerschweinchen* kein Arterenol nachweisen. Die Nebennierenextrakte dieser Tierarten verhielten sich wie reine Adrenalinlösungen. Die Abb. 5 gibt ein Versuchsbeispiel für 3 gleichsinnig ausgefallene Versuche mit Kaninchennebenniere und für 4 Versuche mit Meerschweinchennebenniere.

In dem dargestellten Versuch mit *Kaninchen*nebennierenextrakt betrug das Wirksamkeitsverhältnis zwischen l-Adrenalin und l-Arterenol am Katzenblutdruck, das in den Versuchen der Abb. 2 und 3 mit nur 1 : 3 gefunden wurde, 1 : 4. — 3 γ Adrenalin sind so wirksam wie 0,75 γ

l-Arterenol. Ihrer Wirkung entspricht diejenige von 0,5 cm³ eines nach Frowein hergestellten und dann 4fach verdünnten Extraktes (Abb. 5a). Der große Unterschied in der *Blutdruckwirksamkeit* von Adrenalin und Arterenol (1 : 4) hätte sich bei dem in B vorgenommenen Vergleich blutdruckäquivalenter Mengen am *Darm*, an dem das Wirksamkeitsverhältnis von *Adrenalin* und *Arterenol* 1 : 0,5 beträgt, besonders günstig für den Nachweis auch nur geringer, im Extrakt etwa vorhandener Arterenolmengen auswirken müssen: das Vorhandensein einer auch nur kleinen

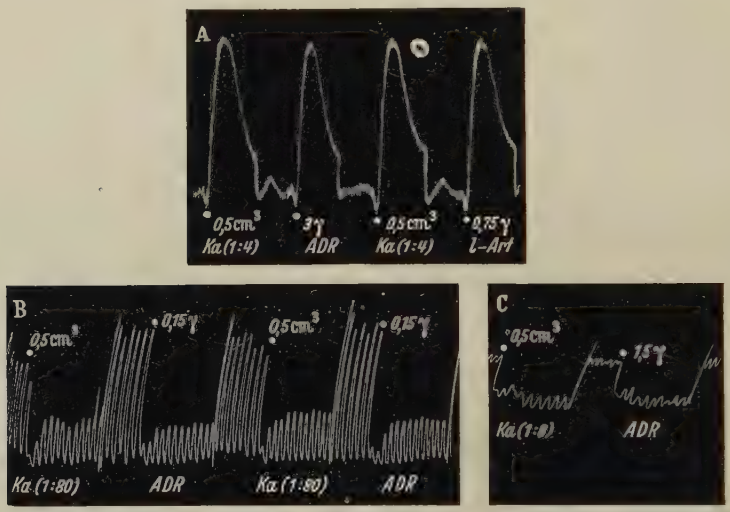


Abb. 5. *Auswertung eines Extraktes aus Kaninchennebennieren an Blutdruck und Darm.* A: *Katzenblutdruck.* Katze 2,6 kg. Pernocton, Atropin, Kokain. 0,5 cm³ Extrakt (Ka) ist gleichwirksam mit 3 γ Adrenalin (ADR) und 0,75 γ l-Arterenol (l-Art.) (l-Arterenol ist in diesem Versuch 4mal wirksamer als Adrenalin). B: *Frischer Kaninchendarm:* Extrakt (Ka) und Adrenalin in 20fach niedrigerer Dosierung als in A. C: *Gelagerter Kaninchendarm:* Extrakt (Ka) und Adrenalin in 2fach niedrigerer Dosierung als in A. *Ergebnis:* Im Gegensatz zu den Nebennierenextrakten von Schwein, Rind und Katze verhält der Kaninchennebennieren-Extrakt sich an allen Testobjekten wie reines Adrenalin.

Arterenolmenge hätte in einer schwächeren Darmwirkung zum Ausdruck kommen müssen. Tatsächlich sind aber Adrenalin und Extrakt in einer Dosierung, die sich am *Blutdruck* als gleichwirksam erwiesen hatte, auch am *Darm* von gleicher Wirksamkeit (B). (Beide — Adrenalin und Extrakt — wurden am Darm 20fach schwächer dosiert als am Blutdruck.) Dem entspricht das Verhalten am *gelagerten* Darm, an dem im Extrakt etwa vorhandenes Arterenol sich in Form einer stärkeren Wirksamkeit des Extraktes ausdrücken müßte, da Arterenol — am *frischen* Darm *schwächer* wirksam als Adrenalin — am *gelagerten* Darm *stärker* wirkt als dieses. In C wirken Extrakt und Adrenalin zwar in 10fach *höherer* Dosierung, aber im *gleichen* Mengen*verhältnis* wie in B auf den *gelagerten* Darm:

auch hier stimmt die Wirkung des Extraktes praktisch vollkommen mit derjenigen des Adrenalins überein.

Das Ergebnis dieser Versuche am frischen und gelagerten *Darm* findet eine Bestätigung durch Untersuchungen am *Katzenblutdruck vor* und *nach Kokain*. Wir haben schon darauf hingewiesen, daß die blutdrucksteigernde Wirkung des *Arterenols* in den meisten Fällen durch Kokain eine stärkere Potenzierung erfährt als diejenige des *Adrenalins*. Es war deshalb anzunehmen, daß Nebennierenextrakte, die am Blutdruck gegen Adrenalin ausgewertet worden waren, *nach Kokain* ihrem Arterenolgehalt entsprechend stärker wirksam sein würden als die Testdosis Adrenalin.

In der Abb. 6 ist ein solcher Versuch mit Extrakten aus *Rinder-*, *Schweine-* und *Meerschweinchennebennieren* dargestellt. Die Extrakte aus *Rinder-* und *Schweine*nebennieren sind *nach* Kokain deutlich wirksamer als die Adrenalindosis, mit der sie *vor* Kokain gleichwirksam waren. Die pressorische Wirkung des Extraktes aus *Meerschweinchen*nebenniere

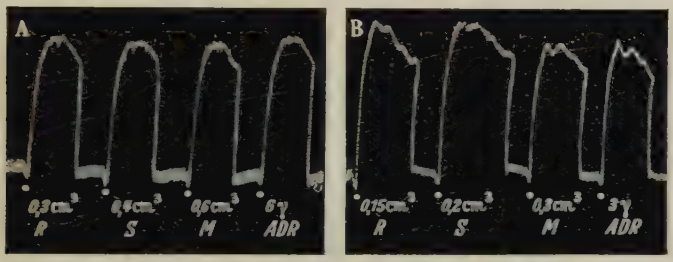


Abb. 6. *Beeinflussung der Blutdruckwirkung von Extrakten aus Schweine-, Rinder- und Meerschweinchennebennieren durch Kokain.* Katze. 3,4 kg. Pernoctonnarkose. 1 mg/kg. Atropin. sulf. i. m. A: Vor Kokain. B: Nach Kokain. ADR = Adrenalin. S = Schweine-, R = Rinder-, M = Meerschweinchennebennierenextrakt. *Ergebnis:* Die Schweine- und Rindernebennierenextrakte werden durch Kokain stärker als Adrenalin potenziert; der Extrakt aus Meerschweinchennebenniere verhält sich wie reines Adrenalin.

stimmt dagegen auch *nach* Kokain mit der Wirkung der Adrenalindosis überein, gegen die er vorher ausgetestet worden war.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Versuche am isolierten *Darm* sprechen somit auch diese Untersuchungen dafür, daß die Nebennieren von *Rindern*, *Schweinen* und *Katzen* neben *Adrenalin* beträchtliche Mengen *Arterenol* enthalten, daß hingegen in *Meerschweinchen-* (und *Kaninchen-*) nebennieren keine nachweisbaren Mengen Arterenol vorhanden sind.

3. Menschliche Nebennierenextrakte.

Wir haben 5 Versuche mit *menschlichen* Nebennieren gemacht. Entnahme und Verarbeitung des Drüsenmaterials konnte *frühestens* 3 Std.

spätestens 8 Std nach dem Tode erfolgen. In 2 Fällen fiel der Arterenolnachweis ähnlich wie in den Versuchen mit *Rinder-* und *Schweine*nebennieren *positiv* aus (Abb. 7). In den 3 anderen Fällen verhielten die Extrakte sich wie reine Adrenalinlösungen. Das Versuchsmaterial ist zu klein, als daß es möglich wäre, eine befriedigende Erklärung dafür zu geben, daß das Versuchsresultat im einen Fall positiv, im anderen negativ war.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Versuche mit *menschlichen* und *tierischen* Nebennierenextrakten haben zu dem Ergebnis geführt, daß die Nebennieren von *Mensch*, *Katze*, *Rind* und *Schwein* neben *Adrenalin* beträchtliche Mengen *Arterenol* — ungefähr bis zu 50% der Adrenalinmenge — enthalten, daß hingegen im Extrakt aus *Kaninchen-* und *Meerschweinchen*nebennieren nur Adrenalin, kein

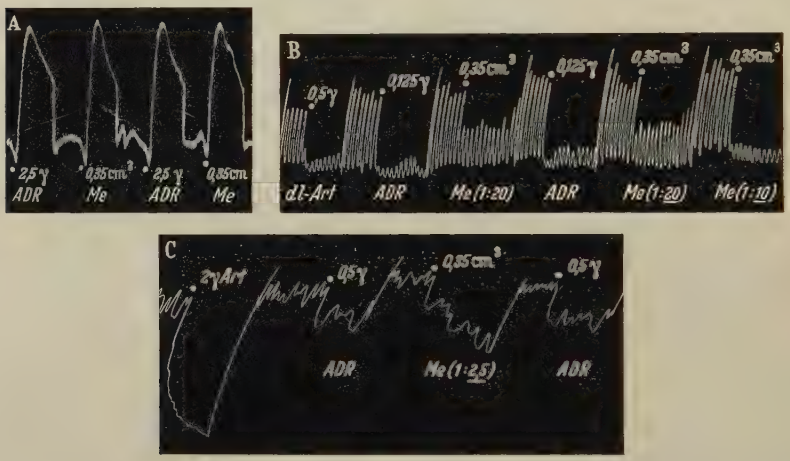


Abb. 7. *Auswertung eines menschlichen Nebennierenextraktes an Blutdruck und Darm.* A: *Katzenblutdruck:* 0,35 cm³ Extrakt (Me) sind gleichwirksam mit 2,5 γ Adrenalin (ADR). B: *Frischer Kaninchendarm:* 20fach geringere Dosierung als in A. 0,125 γ Adrenalin ist wirksamer als die blutdruckäquivalente Extraktmenge 0,35 cm³ Me 1 : 20. Erst die 2fach größere Extraktkonzentration (Me 1 : 10) ist von gleicher Wirksamkeit wie 0,125 γ Adrenalin und 0,5 γ dl-Arterenol, das am frischen Darm 4mal weniger wirksam ist als Adrenalin. C: *Gelagerter Kaninchendarm:* 4fach höhere Dosierung als in B: die am *frischen* Darm mit Adrenalin gleichwirksame Extraktmenge ist — wie Arterenol — am *gelagerten* Darm wirksamer als Adrenalin. *Ergebnis:* Die *schwächere* Wirkung einer mit Adrenalin blutdruckäquivalenten Extraktmenge am *frischen Darm* und die *stärkere* Wirkung der am frischen Darm ausgetesteten Dosis auf den *gelagerten Darm* spricht dafür, daß der Extrakt neben *Adrenalin* auch *Arterenol* enthält.

Arterenol nachweisbar ist. Es erhebt sich die Frage nach der *Ursache* für die bei den verschiedenen Tierarten bestehenden Unterschiede.

1. Die zur Differenzierung zwischen Adrenalin und Arterenol angewandten *Methoden* sprechen, wie wir in früheren Arbeiten[6] ausgeführt haben, erst auf Arterenol an, wenn dieses in dem betreffenden Adrenalin-

Arterenolgemisch 10—15% ausmacht.* Die bei den einzelnen Tierarten gefundenen Unterschiede brauchten deshalb keine *prinzipiellen*, sondern könnten vielleicht nur *graduelle* Unterschiede sein, indem auch in der Kaninchen- und Meerschweinchennebenniere *Arterenol* — obligate und letzte Zwischenstufe bei der Adrenalinsynthese — eine gewisse Anhäufung erführe, — mit dem einen *Unterschied* zu anderen Tierarten eben, daß diese auch bei Kaninchen und Meerschweinchen erfolgende Kumulation unter der methodisch bedingten Grenze der Nachweisbarkeit bliebe. Die *geringere* Kumulation von Arterenol in der Kaninchen- und Meerschweinchennebenniere könnte durch einen leichter und schneller erfolgenden Übergang der „*Vorstufe*" in *Adrenalin* bedingt sein, also auf einem besser und schneller funktionierenden *Methylierungsmechanismus* beruhen, für den im Falle des *Adrenalins* ähnlich wie für die biologische Bildung von *Cholin* und *Kreatin* wahrscheinlich *Methionin* als Methylierungsmittel in Frage kommt.

2. Es ist bekannt, daß es unter den zu *Blutzuckerstudien* am häufigsten benutzten Tierarten bei *Kaninchen* besonders leicht schon auf geringfügige Reize hin zu hpyerglykämischen Reaktionen kommt, die manche Experimentatoren veranlaßt, solche Untersuchungen lieber an Hunden auszuführen. Die besondere „*Labilität*" des Kaninchens in dieser Beziehung könnte natürlich einfach durch eine besonders hohe Empfindlichkeit der Reflexmechanismen verursacht sein, die der Hormonausschüttung aus dem Nebennierenmark zugrunde liegen; sie könnte aber auch — im Lichte unserer Versuchsergebnisse — ihren Grund darin haben, daß die Kaninchen- (und Meerschweinchen-)nebenniere Reizintensitäten und Reizqualitäten, die bei anderen Tierarten zu einer überwiegenden *Arterenol*ausschüttung führen, mit der Ausschüttung von *Adrenalin* beantwortet, das, wie frühere Untersuchungen[3] gezeigt haben, fast 10mal stärker glykämisch wirkt als Arterenol. Bei der vom *Karotissinus* aus reflektorisch auslösbaren Hormonabgabe aus den Nebennieren, von der wir in eigenen Untersuchungen[7a] an *Katzen* zeigen konnten, daß sie vornehmlich Arterenol enthält, scheint es allerdings auch beim *Kaninchen* nicht zum Auftreten nennenswerter Mengen *Adrenalin* im Blute zu kommen, da eine durch Abklemmen der Karotiden bewirkte *Karotissinusentlastung* sowohl bei *Katze* und *Hund* als auch bei *Kaninchen* die Blutzuckerwerte unbeeinflußt läßt[8].

3. In einer dieser Arbeit vorangegangenen Untersuchung[9] über das „Urosympathin" des Tierharns konnten Belege dafür gegeben werden, daß der von uns zuerst im *menschlichen* Harn nachgewiesene adrenalin-

---

Anmerkung bei der Korrektur: Neuere Untersuchungen mit empfindlicheren Methoden bestätigten, daß in Extrakten aus Kaninchen- und Meerschweinchennebennieren kein Arterenol nachweisbar ist. (Holtz, P. u. H. J. Schümann: Arch. internat. pharmacodyn. — Im Druck)

ähnliche, blutdrucksteigernde Stoff auch bei allen untersuchten *Tierarten*, einschließlich *Kaninchen* und *Meerschweinchen*, sich pharmakologisch wie *Arterenol* verhält. Als Quelle des Harn-Arterenols wurden von uns die Nebennieren und die sympathischen — „arterenergischen“[10] Nerven, besonders die Gefäßnerven in Betracht gezogen. Wenn man sich nur auf den Boden der experimentellen Tatsachen stellt und dementsprechend annimmt, daß das negative Ergebnis unserer Versuche, in der Kaninchen- und Meerschweinchennebenniere *Arterenol* nachzuweisen, nicht *methodisch* bedingt ist, sondern daß die Nebennieren dieser Tierarten tatsächlich keine nennenswerten Mengen *Arterenol* enthalten, so würde dadurch nahegelegt, auch bei den anderen Tierarten und beim Menschen wenigstens für die *Hauptquelle* des „Urosympathin“ nicht die Nebennieren, sondern die sympathischen Nervenendigungen zu halten, und in der Höhe der zur Ausscheidung gelangenden Arterenolmenge ein Maß für den Erregungszustand und die „Tonuslage“ des Sympathicus, insbesondere des Gefäßsystems zu erblicken. Es wäre dann verständlich, daß wir unter Verhältnissen, die nach allgemeiner Auffassung durch eine gesteigerte Erregbarkeit des Sympathicus und einen erhöhten Sympathicustonus gekennzeichnet sind, — wie z. B. bei der *essentiellen Hypertonie* eine vermehrte „Urosympathin“-ausscheidung im Harn finden[2].

4. Wenn das negative Resultat unserer Versuche, in der Kaninchen- und Meerschweinchennebenniere *Arterenol* nachzuweisen, nicht auf der zu geringen Empfindlichkeit der angewandten *Methoden*, sondern auf dem tatsächlichen Nicht-vorhandensein von Arterenol beruht, wird damit die schon in einer früheren Arbeit[5] von uns aufgeworfene Frage erneut zur Diskussion gestellt, ob der im Nebennierenmark zum Adrenalin führende *Syntheseweg* obligat und bei allen Tierarten *Arterenol* als Zwischenstufe durchläuft, wobei dann die Methylierung die letzte, die Synthese vollendende Reaktion wäre, oder ob nicht unter Umständen auch *Epinin* Adrenalinvorstufe sein kann, so daß dann die Einführung der OH-Gruppe in die schon methylierte Seitenkette zur letzten chemischen Reaktion der Adrenalinsynthese würde.

5. Die meisten in der Literatur zu findenden Angaben über den *Adrenalingehalt der Nebennieren* basieren auf der Austestung von Nebennierenextrakten am Blutdruck gegen reine Adrenalinlösungen. Nach unseren Befunden würden die so erhaltenen Werte für *Kaninchen-* und *Meerschweinchen*nebennieren zutreffen, für *Rinder-*, *Schweine-*, *Katzen-* und *Menschen*nebennieren hingegen einer Korrektur bedürfen. Die absolute Menge an blutdrucksteigernder Substanz müßte wegen des beträchtlichen Arterenolgehaltes der Nebennieren dieser Tierarten geringer sein als bisher angenommen wurde, da Arterenol blutdruckwirksamer als Adrenalin ist.

6. Die Frage nach der *physiologischen Bedeutung* des in den Nebennieren der meisten Tierarten und des Menschen nachgewiesenen beträcht-

lichen Arterenolvorkommens haben wir in voraufgegangenen Arbeiten dahingehend beantwortet, daß dem Arterenol des Nebennierenmarks nicht nur die Funktion des *chemischen Intermediärproduktes*, sondern daneben auch die Funktion des *selbständigen hormonalen* Faktors zukomme, der wie ein echtes Hormon, z. B. Adrenalin *selbst*, auf den adäquaten Reiz hin zur Ausschüttung aus dem Inkretorgan gebracht werden kann. Unter diesem Gesichtspunkt haben wir vom *Arterenol* als von einem „neuen Hormon" des Nebennierenmarks gesprochen und darauf hingewiesen, daß die charakteristischen pharmakologischen Unterschiede zwischen Arterenol und Adrenalin, z. B. die schwächere *inhibitorische* Wirkung des Arterenols auf Uterus und Darm bei stärkerer *pressorischer* Wirksamkeit, ferner seine weit schwächere Wirkung auf Blutzucker[3] und Grundumsatz[11] es berechtigt erscheinen lassen, in ihm einen körpereigenen hormonalen Wirkstoff „sui generis" zu erblicken, dessen physiologische Aufgabe wohl hauptsächlich die Ausübung spezifischer *regulatorischer* Funktionen wäre, während dem *Adrenalin* als dem großen „Systemstoff", die Ausübung von „Notfallsfunktionen" vorbehalten bliebe. — Die durch Abklemmung der Karotiden verursachte Druckentlastung im *Karotissinusgebiet* stellt, wie wir in Versuchen an Katzen zeigen konnten, eine biologische Situation dar, in der es zur Ausübung eines solchen für eine hormonale Arterenolausschüttung „adaequaten" Reizes kommt. Weshalb unter diesen Umständen vornehmlich *Arterenol* von der Inkretdrüse abgegeben wird, haben wir durch die Hypothese zu erklären versucht, daß die *Qualität* und vielleicht auch die *Intensität* des auf dem Wege der Splanchnici das Nebennierenmark treffenden Reizes darüber entscheidet, ob das eine oder das andere Sympathicomimeticum ins Blut sezerniert wird.

In einem gewissen *Gegensatz* zu dieser Vorstellung scheinen die Ergebnisse einer vor kurzem erschienenen Arbeit von Bülbring und Burn[12] zu stehen. Die Autoren finden, daß die *elektrische Stimulierung* des Splanchnicus zu einer Hormonausschüttung aus dem Nebennierenmark führt, die ihrer pharmakologischen Auswirkung nach zwar aus einem *Gemisch* von Adrenalin und Arterenol bestehen muß, in der aber die Adrenalinkomponente überwiegt. Erst nach mehrfach *wiederholter* Applikation des elektrischen Reizes tritt eine Verschiebung im Mischungsverhältnis der beiden Komponenten zugunsten des Arterenols ein, so daß schließlich fast nur noch reines Arterenol abgegeben wird. Im Gegensatz zu der von uns entwickelten Auffassung würde hier, wenn auch in einem ganz anderen Sinne, nicht *Adrenalin*, sondern *Arterenol* sozusagen zum chemischen Träger einer „*Notfallsfunktion*", zu deren Ausübung der Organismus nach der durch wiederholte elektrische Reize verursachten Entleerung und Erschöpfung der Adrenalindepots im Nebennierenmark gezwungen wäre, und die darin bestände, auf die noch nicht

methylierte *Vorstufe* des eigentlichen Hormons, auf *Arterenol* als *Ersatz* für Adrenalin zurückzugreifen, da die Methylierung der *Vorstufe* nicht Schritt hielt mit der Ausschüttung des *fertigen Hormons*. Unter extremen *experimentellen* Bedingungen erhaltene Ergebnisse sind aber nicht geeignet, Rückschlüsse auf die *physiologische* Funktion und Bedeutung zuzulassen. Die *Auflösung* des in den beiden verschiedenen Auffassungen zum Ausdruck kommenden *Gegensatzes* wird vielleicht durch Berücksichtigung der Tatsache zu finden sein, auf die W. R. Hess[13] in seinem Buche „*Die funktionelle Organisation des vegetativen Nervensystems*" an der Stelle zu sprechen kommt, an der er auf die Unzulässigkeit der auf einer schematisierenden Interpretation von Reizexperimenten an Arterien beruhenden Auffassung hinweist, „daß im Gegenspiel der Gefäßinnervation der *Sympathicus* prinzipiell *konstriktorische*, der *Parasympathicus* ebenso konsequent *vasodilatatorische* Wirkung zur Entfaltung bringe", — der Tatsache nämlich, „daß *elektrische Reizung* eines Nerven nicht *elektiv* wirkt, sondern alle Faserqualitäten, die der Nerv führt, erregt und der zutage tretende Effekt dementsprechend immer nur als *Resultante* von Einflüssen auf die Gefäßmuskulatur angesprochen werden darf". Weiter heißt es dann: „Unter *physiologischen* Bedingungen liegen die Verhältnisse grundsätzlich anders, weil dank *zentral regulierter* Erregungsübertragung einzelne zu einem Nerven gebündelte Faserqualitäten *elektiv* in Aktion gerufen werden können, so z. B. *Vasodilatatoren sympathischer Zugehörigkeit*! Entsprechend ist auch damit zu rechnen, daß Nerven *parasympathischen* Ursprunges *Vasokonstriktoren* führen selbst in jenen Fällen, wo der *elektrische Reiz* mit Vasodilatation beantwortet wird".

Unter diesen Gesichtspunkten würde die *elektrische Stimulierung* des Splanchnicus in den Versuchen der englischen Forscher nicht *elektiv* wirken, sondern alle Faserqualitäten, die der Nerv führt — sowohl die für die *Adrenalin-* als die für die *Arterenol*ausschüttung verantwortlichen —, erregen, so daß der zu Tage tretende Effekt dementsprechend nur die *Resultante* der beiden verschiedenen, das Nebennierenmark gleichzeitig erreichenden Einflüsse darstellen kann, wie er das ja auch tatsächlich tut. Demgegenüber würden bei der unter *physiologischen* Bedingungen von den pressorischen Zonen des Karotissinus aus hervorgerufenen *reflektorischen* Nervenerregung „dank *zentral regulierter* Erregungsübertragung" einzelne zu einem Nerven gebündelte Faserqualitäten *elektiv* in Aktion gerufen, diejenigen, denen die Funktion einer elektiven Ausschüttung von *Arterenol* aus dem Nebennierenmark zukommt.

Zusammenfassung.

1. Die Austestung tierischer und menschlicher Nebennierenextrakte am *Blutdruck* sowie am *frischen* und mehrere Tage *gelagerten Kaninchen-*

darm führt zu dem Ergebnis, daß die Nebennieren von *Schwein*, *Rind*, *Katze* und *Mensch* neben *Adrenalin* beträchtliche Mengen *Arterenol* enthalten. Das Mengenverhältnis beträgt ungefähr zwei Drittel Adrenalin zu ein Drittel Arterenol.

Demgegenüber läßt sich in Nebennierenextrakten von *Kaninchen* und *Meerschweinchen kein* Arterenol nachweisen: die Nebennierenextrakte dieser Tierarten verhalten sich vielmehr an den für die Untersuchung benutzten Testobjekten wie reine Adrenalinlösungen.

2. Die *Ursache* für die bei den verschiedenen Tierarten bestehenden *Unterschiede*, die physiologische *Bedeutung* und *Funktion* des in den Nebennieren der meisten Tierarten und des Menschen nachgewiesenen Arterenols sowie die Beziehungen zwischen *Nebennieren*arterenol und *Harn*arterenol („Urosympathin") werden besprochen.

Literatur.

[1] Holtz, P., u. H. J. Schümann: Naturwiss. **1948**, 159. — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 484 (1949). — Schümann, H. J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 475 (1949). — Holtz, P., H. J. Schümann, W. Langenbeck, u. H. le Blanc: Naturwiss. **1948**, 191. — [2] Holtz, P., K. Credner, u. G. Kroneberg: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 228 (1944/47). — [3] Schümann, H. J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 164 (1949). — Klin. Wschr. **1948**, 605. — [4] Holtz, P., u. H. J. Schümann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 484 (1949). — Schümann, H. J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (im Druck). — [5] Holtz, P., u. G. Kroneberg: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 150 (1949). — [6] Schümann, H. J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 340 (1950). — Kroneberg, G., u. H. J. Schümann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 350 (1950). — Holtz, P., G. Kroneberg u. H. J. Schümann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 364 (1950). — [7] Frowein, B.: Biochem. Z. **134**, 558 (1923). — [8] Holtz, P. u. H. J. Schümann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 49 (1949). — [9] Brauch, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **175**, 104 (1934). — [10] Holtz, P.: Klin. Wschr. **1949**, 64. — [11] Kroneberg, G., u. H. G. Rönicke: Klin. Wschr. (im Druck). — [12] Bülbring, E., and J. H. Burn: Brit. J. Pharmacol. **4**, 202 (1949). — [13] Hess, W. R.: Die funktionelle Organisation des vegetativen Nervensystems, S. 51. Basel: Benno Schwabe & Co. 1948.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 16—22 (1950).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg/L.

Über den Einfluß von Alkoholen auf den enzymatischen Abbau des Tyramins.

Von

FRITZ HEIM.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. Oktober 1949.)

In früheren Arbeiten wurden einige Pharmaka aus der Ephedrin-Pervitinreihe[1], das Xanthin und Xanthinderivate[2] und mehrere Ester aus der Gruppe der Lokalanästhetika sowie deren Spaltprodukte[3] hinsichtlich ihres Einflusses auf die Geschwindigkeit des oxydativen Abbaus des Adrenalins und anderer aromatischer Amine untersucht. In der vorliegenden Arbeit prüften wir den Einfluß von Alkoholen auf diesen enzymatischen Vorgang, und zwar untersuchten wir den Methyl-, Äthyl-, n-Propyl-, Isopropyl-, Butyl-, Amyl- und Oktylalkohol, den zweiwertigen Alkohol Äthlyenglykol, das dreiwertige Glyzerin und weiterhin im Vergleich mit dem Äthylalkohol entsprechende Aminoalkohole, und zwar den Aminoäthylalkohol, den Diäthylaminoäthylalkohol und schließlich das Cholin.

Die Methodik entsprach der in einer früheren Arbeit[3] mitgeteilten. Sie besteht im Prinzip darin, daß der bei der fermentativen Desaminierung und Oxydation aromatischer Amine verbrauchte Sauerstoff manometrisch gemessen wird. Diese an der Seitenkette des Moleküls stattfindende Reaktion wird durch die, vor allem in Meerschweinchenleber und -Niere vorhandene Aminoxydase bewerkstelligt. Der dabei entstehende Aldehyd wird unter O_2-Aufnahme — vermutlich zur Säure — weiter oxydiert. Als Fermentquelle verwendeten wir Meerschweinchenleber, die im Verhältnis 1 : 9 mit einem m/7,5 Phosphatpuffer von p_H = 7,4 extrahiert wurde. Als Substrat benutzten wir 0,02 m Mol Adrenalinhydrochlorid, bzw. in den meisten Fällen 0,02 m Mol Tyraminhydrochlorid, da das Tyramin rascher oxydativ abgebaut wird als das Adrenalin. Die Versuche wurden in der Warburgapparatur bei 35° in reiner O_2-Atmosphäre durchgeführt. Da Aminoäthylalkohol und Diäthylaminoäthanol Basen sind, das Semikarbazidhydrochlorid andererseits sauer reagiert, so müssen vor Verwendung die Lösungen dieser Körper neutralisiert werden.

Befunde:

1. *Methylalkohol.* In der von uns untersuchten 0,36—0,00045 molaren Konzentration beschleunigt Methylalkohol den oxydativen Abbau des Tyramins. In Abb. 1 wurde die Geschwindigkeit der fermentativen Oxydation von 0,02 m Mol Tyramin durch einen Phosphatpufferextrakt aus 0,35 g Meerschweinchenleber ohne und in Gegenwart von Methylalkohol in 0,18—0,0018 molarer Konzentration kurvenmäßig dargestellt. Mit steigender Alkoholmenge nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit entsprechend zu. Da das unter der katalytischen Wirkung der Aminoxydase bis zum Aldehyd oxydierte Substrat unter Aufnahme von molekularem Sauerstoff weiter oxydiert wird, in Gegenwart von Semikarbazid jedoch die Reaktion im Stadium der Aldehydbildung sistiert, so ist die O_2-Verbrauchsmessung erst in Gegenwart von Semikarbazid im Versuchsansatz ein quantitativer Maßstab für die Aktivität der Aminoxydase. Ein derartiger Versuch wurde in Abb. 2 wiedergegeben. Wie aus einem Vergleich der Kurve 1a mit Kurve 2a hervorgeht, wird auch in den Versuchsansätzen mit Semikarbazid unter der Einwirkung von Methylalkohol mehr Sauerstoff verbraucht als im Ansatz ohne Alkohol, so daß mit Sicherheit daraus auf eine Aktivierung der Aminoxydase durch Methylalkohol geschlossen werden kann.

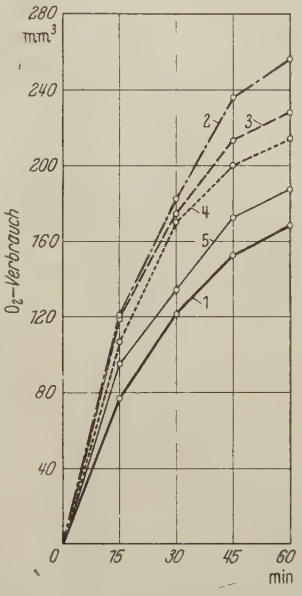


Abb. 1. Der Einfluß von Methylalkohol auf die Geschwindigkeit der fermentativen Oxydation von Tyramin. Kurve 1 : 3,5 cm³ Phosphatpufferextrakt aus 0,35 g Meerschweinchenleber p_H = 7,4 + 1 m g NaCN + 0,02 mMol Tyraminhydrochlorid in 1,0 cm³ H_2O + 1,0 cm³ H_2O. Kurve 2: Wie Kurve 1 + Methylalkohol in 0,18 mol. Konzentr. Kurve 3: Wie Kurve 1 + Methylalkohol in 0,036 mol. Konzentr. Kurve 4: Wie Kurve 1 + Methylalkohol in 0,009 mol. Konzentr. Kurve 5: Wie Kurve 1 + Methylalkohol in 0,0018 mol. Konzentr.

2. *Äthylalkohol.* Er beschleunigt in 0,36—0,0018 molarer Konzentration den oxydativen Abbau des Tyramins, wie auch aus Abb. 3 hervorgeht und zwar nimmt der Grad der Aktivierung mit steigender Konzentration zu. Auch die Wirkung des Äthylalkohol besteht in einer Aktivierung der die Umwandlung des Tyramins in den entsprechenden Aldehyd katalysierenden Aminoxydase, wie ein mit Semikarbazidzusatz durchgeführter, in Abb. 4 wiedergegebener Versuch zeigt. Wie aus einem Vergleich der Kurven der Abb. 3 mit denen der Abb. 1 hervorgeht, wird der oxydative Abbau des Tyramins durch höhere Konzentrationen von Äthylalkohol stärker beschleunigt als durch Methylalkohol, doch wird wie die mit Semikarbazid durchgeführten in Abb. 2 und 4 wiedergegebenen

Versuche zeigen, nicht etwa die Aminoxydase durch Äthylalkohol stärker aktiviert als durch Methylalkohol, sondern nur die weitere Oxydation des Aldehyd erfährt durch den Äthylalkohol eine größere Beschleunigung. Den zahlreichen Beobachtungen über die Hemmung enzymatischer Vorgänge durch Äthylalkohol stehen nach KOCHMANN[4] nur sehr wenige Befunde über eine Aktivierung von Fermenten durch diesen Körper gegenüber. Die Aminoxydase gehört nach unseren Befunden zu den Fermenten, die durch Äthylalkohol in einem weiten, gerade in pharmakologischer Hinsicht interessierenden Konzentrationsbereich ausschließlich

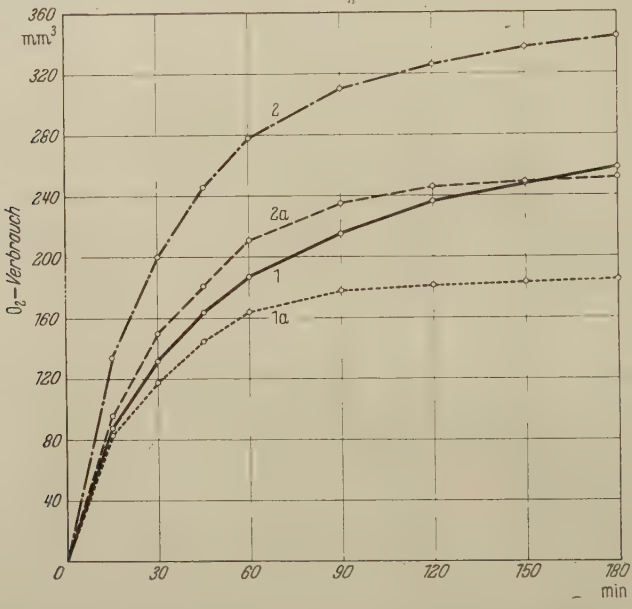


Abb. 2. Der Einfluß von Methylalkohol auf die Geschwindigkeit der fermentativen Oxydation von Tyramin ohne und in Anwesenheit von Semicarbacid. Kurve 1: 3,5 cm³ Phosphatpufferextrakt aus 0,35 g Meerschweinchenleber p_H = 7,4 + 1 mg NaCN + 0,02 mMol Tyraminhydrochlorid in 1,0 H_2O + 1,0 cm³ H_2O. Kurve 1a: Wie Kurve 1 + 30 mg Semicarbacidhydrochlorid. Kurve 2: Wie Kurve 1 + Methylalkohol in 0,018 mol. Konzentr. Kurve 2a: Wie Kurve 1 + 30 mg Semicarbacidhydrochlorid + Methylalkohol in 0,018 mol. Konzentr.

aktiviert wird. In prinzipiell der gleichen Weise wie beim Tyramin wird auch der oxydative Abbau des Adrenalins durch Methyl- und Äthylalkohol beschleunigt, worauf bereits in einer früheren Arbeit[3] hingewiesen wurde. Es bestehen hierbei nur gewisse quantitative Unterschiede. Für die Beurteilung der pharmakologischen Wirkung des Äthylalkohols ist es nicht unwichtig, daß er nach unseren Beobachtungen in 0,18 molarer Konzentration den fermentativen Abbau z. B. des Tyramins um 100% beschleunigt. Diese Konzentration, die 6500 mg im Liter entspricht, ruft als Blutalkoholspiegel nach den Beobachtungen von NAVILLE[5], TURNER[6]

und Nicloux[7] den Zustand schwerer Betrunkenheit hervor. Blutalkoholkonzentrationen von 1000—2000 mg/l, die nach Beobachtungen der genannten Autoren leichte Betrunkenheit erzeugen, beschleunigen nach unseren Befunden die Anfangsgeschwindigkeit des oxydativen Abbaus von Tyramin noch um 75%. Bei Alkoholkonzentrationen, die als Normalwerte beim erwachsenen Menschen gefunden werden (nach Schweisheimer[8] 33 mg/l, nach Kionka[9] 38,6 mg/l, nach Baglioni[10] 40 mg/l) erlischt auch die Aminoxydase aktivierende Wirkung des Äthylalkohols.

3. *Propylalkohol.* Wie der Abb. 5 zu entnehmen ist, hemmt der n-Propylalkohol in 0,36 molarer Konzentration den oxydativen Abbau des Tyramins, während er in halber Konzentration diesen Vorgang beschleunigt. Diese Fähigkeit zu aktivieren reicht bis zu einer Verdünnung von 0,009 molar.

4. *Isopropylalkohol,* der in 0,36 molarer Lösung eiweißfällend und deshalb fermenthemmend wirkt, ist in Konzentrationen von 0,18 molar abwärts im Gegensatz zu Methyl-, Äthyl- und n-Propylalkohol ohne Einfluß auf die Geschwindigkeit des oxydativen Abbaus von Tyramin.

5. *Butyl-, Amyl- und Oktylalkohol,* die im Gegensatz zu den bisher untersuchten Körpern dieser Reihe sehr wenig in Wasser löslich sind, zeigen in den von uns untersuchten Konzentrationen von 0,18—0,0018 molar nur die Aminoxydase hemmende Eigenschaften. In Abb. 6 wurde die Wirkung von Isopropyl-, Butyl-, Amyl- und Oktylalkohol in 0,036 molarer Konzentration auf die Geschwindigkeit des oxydativen Abbaus des Tyramins kurvenmäßig zur Darstellung gebracht. Es scheint daraus hervor zu gehen, daß die Ferment hemmende Wirkung der höheren aliphatischen Alkohole mit der Länge der Kohlenwasserstoffkette zunimmt.

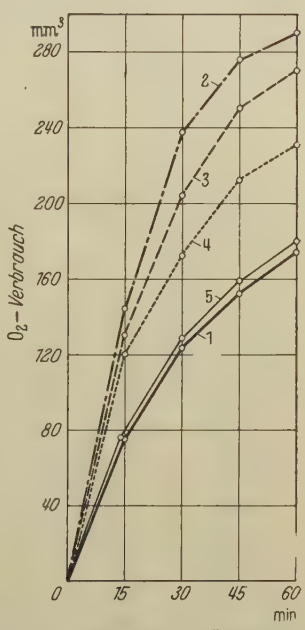


Abb. 3. Der Einfluß von Äthylalkohol auf die Geschwindigkeit der fermentativen Oxydation von Tyramin. Kurve 1: 3,5 cm³ Phosphatpufferextrakt aus 0,35 g Meerschweinchenleber pH = 7,4 + 1 mg NaCN + 0,02 mMol Tyraminhydrochlorid in 1,0 cm³ H_2O + 1,0 cm³ H_2O. Kurve 2: Wie Kurve 1 + Äthylalkohol in 0,18 mol. Konzentr. Kurve 3: Wie Kurve 1 + Äthylalkohol in 0,036 mol. Konzentr. Kurve 4: Wie Kurve 1 + Äthylalkohol in 0,009 mol. Konzentr. Kurve 5: Wie Kurve 1 + Äthylalkohol in 0,0018 mol. Konz.

Den bisherigen Beobachtungen entnehmen wir, daß der Wirkungscharakter der einwertigen Alkohole gegenüber der Aminoxydase von der Länge der Kohlenwasserstoffkette bestimmt wird. Während die 2 ersten Körper dieser Reihe das Ferment ausschließlich aktivieren, übt der

n-Propylalkohol in niedrigen Konzentrationen einen aktivierenden, in höheren Konzentrationen bereits einen hemmenden Einfluß auf dieses Ferment aus. Da Isopropylalkohol die Aktivität der Aminoxydase unbeeinflußt läßt, stellt er pharmakologisch gesehen, sozusagen den Übergang dar zu den höheren Alkoholen, die ausschließlich im hemmenden Sinne auf die fermentative Desaminierung und Oxydation aromatischer Amine wirken.

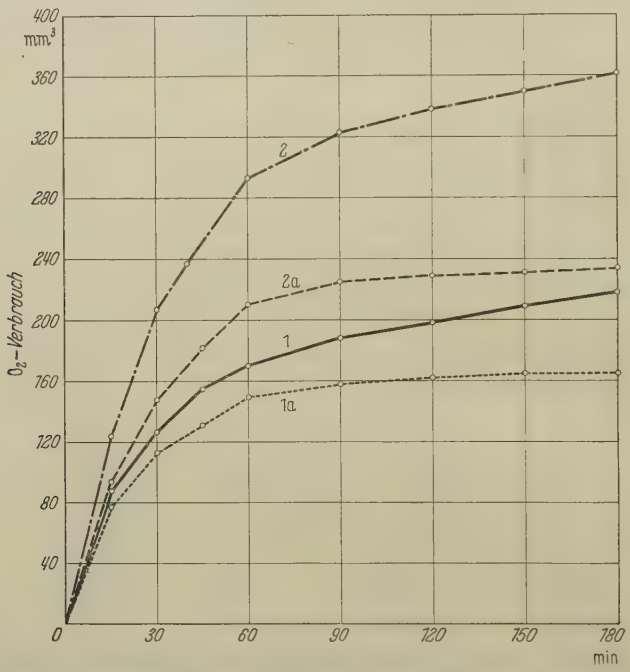


Abb. 4. Der Einfluß von Äthylalkohol auf die Geschwindigkeit der fermentativen Oxydation von Tyramin ohne und in Anwesenheit von Semicarbacid. Kurve 1: 3,5 cm³ Phosphatpufferextrakt aus 0,35 g Meerschweinchenleber p_H = 7,4 + 1 mg NaCN + 0,02 mMol Tyraminhydrochlorid in 1,0 H_2O + 1,0 cm³ H_2O. Kurve 1a: Wie Kurve 1 + 30 mg Semicarbacidhydrochlorid. Kurve 2: Wie Kurve 1 + Äthylalkohol in 0,018 mol. Konzentr. Kurve 2a: Wie Kurve 1 + 30 mg Semicarbacidhydrochlorid + Äthylalkohol in 0,018 mol. Konzentr.

6. *Aethylenglykol und Glyzerin* hemmen in den untersuchten Konzentrationen zwischen 0,18 und 0,0018 molar den oxydativen Tyraminabbau nur sehr schwach. So beträgt die Hemmungswirkung von Äthylenglykol in 0,18 molarer Konzentration 9%, die des Glyzerin in gleicher Konzentration 12%. Bei Verwendung schwächerer Konzentrationen ist die Wirkung noch geringer.

7. *Aminoalkohole.* Durch Substitution eines H-Atomes am β-Kohlenstoffatom des Äthylalkohols durch eine NH_2-Gruppe werden die stark Aminoxydase aktivierenden Eigenschaften des Äthanols in eine Hemmungswirkung umgekehrt. Doch scheint die Leber imstände zu sein, den

Aminoäthylalkohol zu desaminieren, denn nach einer anfänglichen Hemmung des Tyraminabbaus in Gegenwart von Aminoäthanol erfährt dieser Vorgang über eine Phase der abnehmenden Hemmungswirkung schließlich eine Beschleunigung, die vielleicht als Folge des aus dem Aminoäthylalkohol wieder entstehenden Äthanols erklärt werden kann. Durch Alkylierung der NH_2-Gruppe wird die Aminoxydase hemmende Wirkung verstärkt. Der Diäthylaminoäthylalkohol wirkt in den ent-

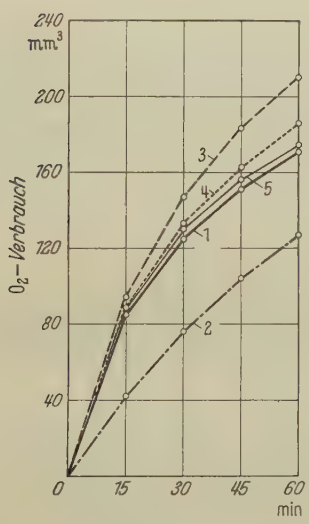


Abb. 5.

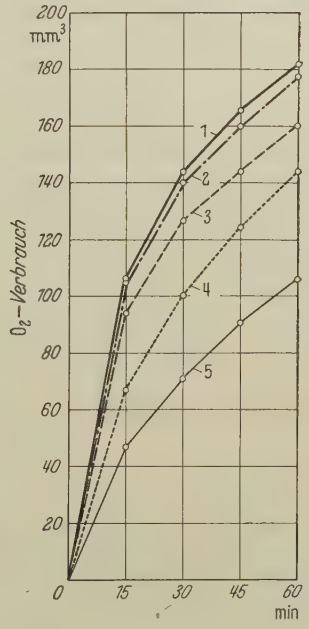


Abb. 6.

Abb. 5. Der Einfluß von n-Propylalkohol auf die Geschwindigkeit der fermentativen Oxydation von Tyramin. Kurve 1: 3,5 cm³ Phosphatpufferextrakt aus 0,35 g Meerschweinchenleber $p_H = 7{,}4$ + 1 mg NaCN + 0,02 mMol Tyraminhydrochlorid in 1,0 cm³ H_2O + 1,0 cm³ H_2O. Kurve 2: Wie Kurve 1 + n-Propylalkohol in 0,36 mol. Konzentr. Kurve 3: Wie Kurve 1 + n-Propylalkohol in 0,18 mol. Konzentr. Kurve 4: Wie Kurve 1 + n-Propylalkohol in 0,036 mol. Konzentr. Kurve 5: Wie Kurve 1 + n-Propylalkohol in 0,009 mol. Konzentr.

Abb. 6. Der Einfluß von Isopropyl-, Butyl-, Amyl- und Oktylalkohol in 0,036 mol. Konzentr. auf die Geschwindigkeit der fermentativen Oxydation von Tyramin. Kurve 1: 3,5 cm³ Phosphatpufferextrakt aus 0,35 g Meerschweinchenleber $p_H = 7{,}4$ + 1 mg NaCN + 0,02 mol Tyraminhydrochlorid in 1,0 cm³ H_2O + 1,0 cm³ H_2O. Kurve 2: Wie Kurve 1 + Isopropylalkohol. Kurve 3: Wie Kurve 1 + Butylalkohol. Kurve 4: Wie Kurve 1 + Amylalkohol. Kurve 5: Wie Kurve 1 + Oktylalkohol.

sprechenden Konzentrationen mehr als doppelt so stark hemmend als der einfache Aminoalkohol. Cholin, das man als einen Äthylalkohol auffassen kann, in dem ein Wasserstoffatom durch eine alkylierte Ammoniumhydoxydgruppe ersetzt ist, hemmt in höheren Konzentrationen den Tyraminabbau sehr schwach, während Konzentrationen zwischen 0,018 und 0,0018 molar einen sehr geringen aktivierenden Einfluß ausüben.

Zusammenfassung.

In der Reihe der einwertigen Alkohole beschleunigen Methyl-, Äthyl- und n-Propylalkohol den oxydativen Abbau des Tyramins, Isopropylalkohol verhält sich indifferent, Butyl-, Amyl- und Oktylalkohol hemmen diesen Vorgang.

Äthylenglykol und Glyzerin hemmen wenig, Aminoäthylalkohol und Diäthylaminoäthanol hemmen in stärkerem Maße den fermentativen Tyraminabbau. Cholin übt in höheren Konzentrationen einen geringen aktivierenden Einfluß darauf aus.

Literatur.

[1] Heim, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 520 (1947). — [2] Heim, F., u. R. Reim: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 703 (1949). — [3] Heim, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 181 (1950). — [4] Kochmann, M.: In Heffters Handbuch d. exper. Pharmakolog., Bd. I u. Erg.-Bd. II. — [5] Naville, F.: Rev. med. Suisse rom. **48**, 849 (1928). — [6] Turner, R. G.: J. of biol. Chem. **92** (1931). — [7] Nicloux, M.: Rech. experim. sur l'éléminat. de l'alc. dans l'organism. Paris 1928. — [8] Schweisheimer: Dtsch. Arch. klin. Med. **109**, 271 (1931). — [9] Kionka, H.: Pharmakol. Beiträge zur Alkoholfrage. Jena 1927. — [10] Baglioni, S.: Atti Acad. naz. Lincei, Rend. Ser. **6**, 545 (1926).

Prof. Dr. Fritz Heim, Marburg/Lahn, Pharmakolog. Institut.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 23—30 (1950).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky).

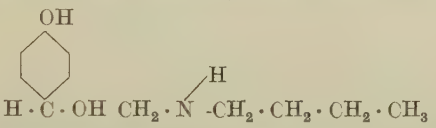
Über adrenolytische Wirkungen von d, l, 1-(4-oxy-phenyl)-1-oxy-2-n-butylamino-aethan.*

Von
Werner Förster, Gustav Kuschinsky und Heinz Lüllmann.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 22. August 1949.)

R. Duesberg[1] hat einige Derivate des Sympatols an Hunden und an Menschen auf ihre Blutdruckwirkungen untersucht. Er fand dabei bemerkenswert langanhaltende blutdrucksenkende Wirkungen, besonders des d, l, 1-(oxy-phenyl)-1-oxy 2-n-butylamino-aethan. (Butylsympatol).



Bei dieser Substanz ist im Molekül des Sympatols eine Methylgruppe am Stickstoff durch eine Butylgruppe ersetzt.

BS wurde von K. Unna[2] 1937 bereits pharmakologisch untersucht. Der Autor hatte dabei mit BS an Durchströmungspräparaten von Hunde-Hinterextremitäten gefäßerweiternde Wirkungen beobachtet. Ferner ergaben Versuche an Kaninchen, Hunden und Katzen Senkungen des Blutdruckes. Diese Befunde führten Duesberg auf der Suche nach klinisch brauchbaren Gefäßerweiterern zur Untersuchung der genannten Substanz. Auch Lands, Rickards, Nash und Hooper[3] haben pharmakologische Untersuchungen über homologe n-Propyl-, Isopropyl-, n-Butyl-, sek. Butyl-, tert. Butyl- und Isobutyl-Verbindungen gemacht. Auch sie fanden blutdrucksenkende Wirkungen aller genannten Substanzen bei narkotisierten Hunden. Nach diesen Tierversuchen waren in bezug auf Toxizität bei Mäusen und Dauer der Blutdruckwirkung die Propylderivate günstiger als die Butylverbindungen. Marsh und Herring[4] haben auch gefäßerweiternde Wirkungen von n-Butyl- und tert. Butyl-Verbindungen an Hunden und durchströmten Katzenherzen gesehen. Duesberg fand beim Hund und auch beim Menschen, daß die Butylverbindung weniger toxische Nebenwirkungen zeigte.

Wir haben die Wirkung von BS am Blutdruck von Hunden, Katzen und Kaninchen untersucht, sowie eine Reihe von Versuchen an isolierten Organen durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß der Adrenalin-Effekt durch BS unter bestimmten Bedingungen abgeschwächt oder aufgehoben werden konnte.

* Das salzsaure Salz dieser Verbindung wird unter dem Namen „Vaskulat" von der Firma Boehringer-Ingelheim in den Handel gebracht und wurde uns für unsere Versuche freundlichst zur Verfügung gestellt.

Methodik.

1. *Die Blutdruckversuche an Hunden* wurden in Chloralose- bzw. Pernoctonnarkose, an Katzen in Chloralose- und an Kaninchen in Urethannarkose durchgeführt. Die Blutgerinnung wurde durch Gegenstrominfusion nach Trendelenburg verhindert. Bei Störungen der Spontanatmung wurden die Tiere künstlich beatmet. Der Blutdruck wurde in der Karotis gemessen.

2. *Die Versuche am Froschherzen* (Temporarien und Esculenten) wurden nach der Methode von Straub durchgeführt.

3. *Samenblase des Meerschweinchens:* Es wurde die Methode von Brügger[5] benutzt, deren Ergebnisse wir in bezug auf die Empfindlichkeit der Samenblase bestätigen konnten.

4. *Am Uterus des Kaninchens* wurde die Methode von Rothlin und Brügger[6] verwendet. Ferner wurden Versuche am *Uterus der Ratte* und *Uterus der Maus* nach der Methode von Magnus untersucht.

5. *Jejunum des Kaninchens* und *Ileum der Ratte* wurden gleichfalls nach Magnus untersucht.

Alle im folgenden angeführten Ergebnisse ließen sich, wenn nicht anders angegeben, in mindestens 10 Fällen an verschiedenen Präparaten demonstrieren.

Versuchsergebnisse.

1. Blutdruckversuche.

a) *Versuche an Katzen.* Am Blutdruck der Katze trat bei 13 Versuchstieren nach Gaben von BS stets eine blutdrucksenkende Wirkung auf. Der Dosenbereich lag zwischen 0,25 mg und 200 mg/kg intravenös, in der

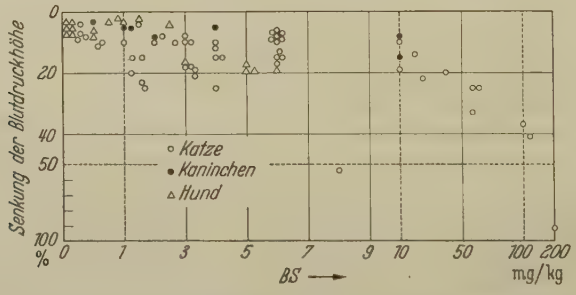


Abb. 1. Größe der Blutdrucksenkung durch BS bei Katzen, Kaninchen und Hunden. Abszisse: Dosen des BS in mg/kg Körpergewicht. Ordinate: Blutdrucksenkung in Prozent der Ausgangshöhe.

überwiegenden Zahl der Fälle jedoch zwischen 0,25 mg und 6 mg/kg intravenös. Die Blutdrucksenkung betrug im allgemeinen 5—25% der Ausgangsblutdruckhöhe, bei den hohen Dosen fiel der Blutdruck um 40 bis 50% (siehe Abb. 1). Die Wirkung des BS hielt nach mittleren Dosen etwa 5—10 min, nach großen Dosen in einigen Fällen ½—1 Std an.

b) *Versuche an Hunden und Kaninchen.* Am Blutdruck der Hunde und Kaninchen (4 Hunde und 2 Kaninchen) war die blutdrucksenkende Wirkung ähnlich wie bei den Versuchen an Katzen.

Bei Hunden lag der Dosenbereich zwischen 0,1 mg und 6 mg/kg intravenös, bei Kaninchen zwischen 0,5 mg und 10 mg/kg intravenös. Die Blutdrucksenkung betrug 5—20% der Ausgangshöhe (siehe Abb. 1). Wirkungsdauer etwa 5—10 min.

c) *Aufhebung der Wirkung von Adrenalin, Nor-Adrenalin und Sympatol am Blutdruck.* In Versuchen an Katzen wurde die blutdrucksteigernde Wirkung von Adrenalin (1,5—7,0 γ/kg intravenös) durch gleichzeitige Gaben von BS abgeschwächt oder aufgehoben. Die Dosen BS bewegten sich dabei zwischen 10 und 100 mg/kg intravenös. Für die Abschwächung der Adrenalin-Wirkung war ein Dosenverhältnis Adrenalin : BS wie 1:24000 (1 Beobachtung), für die Aufhebung der Adrenalinwirkung (keinerlei Blutdruckveränderung) ein Verhältnis von 1 : 30000

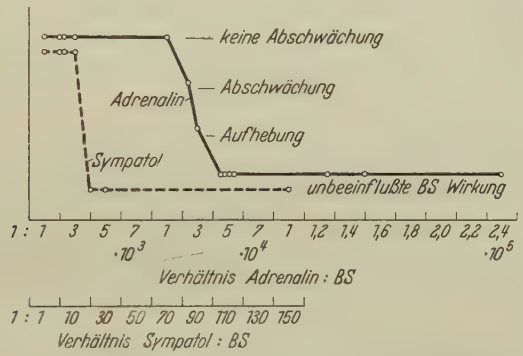


Abb. 2. Änderung der Blutdruckwirkungen von Sympatol bzw. Adrenalin bei gleichzeitiger Gabe von BS. Abszisse: Verhältnis der Dosen von Sympatol bzw. Adrenalin zu BS. Ordinate Beeinflussung der Sympatol- bzw. Adrenalin-Wirkung durch die gleichzeitige BS-Gabe.

(1 Beobachtung) nötig, während bei einem Verhältnis von 1 : 50000—1 : 240000 die eigene blutdrucksenkende Wirkung des BS auftrat (7 Einzelbeobachtungen) und bei 1 : 1000—1 : 10000 keinerlei Abschwächung der Adrenalin-Eigenwirkung durch BS zu beobachten war (5 Beobachtungen) (s. Abb. 2).

Mit d, l-Nor-Adrenalin (= d, l-Arterenol) war bei Kaninchen das Dosenverhältnis Arterenol : BS für unbeeinflußte Arterenolwirkung 1 : 5000—1 : 20000 (3 Beobachtungen), während bei 1 : 50000 die blutdrucksenkende BS-Eigenwirkung auftrat (1 Beobachtung). Die Arterenoldosen lagen zwischen 2 und 8 γ/kg.

Entsprechende Versuche mit Sympatol ergaben bei einem Dosenverhältnis Sympatol : BS wie 1 : 1—1 : 10 keine Abschwächung der Sympatolwirkung (4 Beobachtungen), während bei einem Verhältnis von 1 : 20 und mehr die unbeeinflußte BS-Eigenwirkung zu beobachten war

(3 Fälle). Die Dosierung des Sympatols lag bei 300 γ/kg intravenös (siehe Abb. 2).

Eine vorhandene Blutdrucksenkung durch BS ließ sich durch 2 min später injiziertes Adrenalin nur bis zu einem Verhältnis Adrenalin : BS wie 1 : 5000 durchbrechen. Bei einem Verhältnis 1 : 50000 und mehr war die Blutdruckwirkung des nachfolgenden Adrenalin abgeschwächt (6 Einzelbeobachtungen). Die absoluten Dosen für Adrenalin und BS waren dieselben wie in den obengenannten Versuchen.

Bei Adrenalin-Dauerinfusionen von 2—60 γ/kg/min ließ sich der Blutdruck von Katzen, Hunden und Kaninchen durch intravenöse Zufuhr

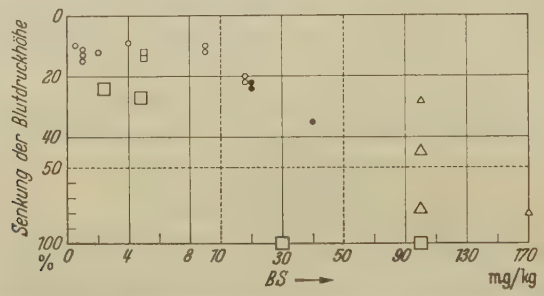


Abb. 3. Durchbrechung einer Adrenalin- und Arterenol-Dauerinfusion durch BS. Abszisse: Dosen des BS in mg/kg Körpergewicht. Ordinate: Blutdrucksenkung in Prozent der Ausgangshöhe.

○ △ □ △ □

0—5 5—10 10—20 20—30 30—60 γ/kg/min Adrenalin-Dauerinfusion

● 5γ/kg/min Arterenol-Dauerinfusion.

von BS in allen Fällen (20 Einzelbeobachtungen) senken. Bei 2—5 γ/kg/-min Adrenalin und 0,5—18 mg/kg BS betrug die Senkung 10—20%, bei 5—10 γ/kg/min Adrenalin und 100—170 mg/kg BS betrug die Senkung 28 bzw. 80%, bei 10—20 γ/kg/min Adrenalin und 5 mg/kg BS 12%, bei 20—30 γ/kg/min Adrenalin und 100 mg/kg BS 45—75%, bei 30 bis 60 γ/kg/min Adrenalin und 30—100 mg/kg BS 25—100% der Ausgangsblutdruckhöhe (siehe Abb. 3). Bemerkenswert an diesen Ergebnissen war, daß selbst sehr hohe Konzentrationen von Adrenalin durch sehr kleine Dosen BS durchbrochen werden konnten und daß die Größe der Blutdrucksenkung mehr von der Adrenalinkonzentration als von der BS-Dosis abhängig zu sein schien.

Der Blutdruck nach einer Arterenol-Dauerinfusion von 5 γ/kg/min wurde durch 20—40 mg/mg BS um 20—35% der Ausgangshöhe gesenkt (3 Einzelbeobachtungen)*.

* d, l-Arterenol = d, l-nor-Adrenalin wurde uns von der Fa. Farbwerke Höchst, Ergotamin und DHE von Herrn Prof. Rothlin, Sandoz A.G. Basel in freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

2. Versuche am Froschherzen.

a) *Einfluß von BS und Dihydroergotamin (DHE) auf den Adrenalineffekt.* BS erzeugt am Straubschen Froschherzen (Esculenten im Winter) in Konzentrationen von $1 : 5 \cdot 10^4$ bis $1 : 10^4$ eine Abnahme der Amplitude. In höheren Verdünnungen war keinerlei Eigenwirkung zu beobachten. Dagegen ließ sich die fördernde Wirkung einer Adrenalinverdünnung $1 : 10^8$ durch BS-Gaben in einer Verdünnung $1 : 10^5$ beseitigen, wenn BS etwa 1 min vor dem Adrenalin dem Kanüleninhalt zugefügt wurde. Diese Wirkung war durch Auswaschen völlig reversibel. In einigen Versuchen erzeugte die nachfolgende Adrenalingabe nicht nur keine Förderung, sondern sogar eine Verminderung der Amplitude. In derselben Weise wie durch BS ließ sich auch durch DHE eine Aufhebung der Adrenalinwirkung erzeugen. Auch hier bewirkte nach dieser Vorbehandlung Adrenalin in einigen Fällen sogar eine Verminderung der Amplitude. Die wirksamen Konzentrationen des DHE lagen in demselben Bereich wie bei BS und zeigten keine Eigenwirkung. In den meisten Fällen war eine 100- bis 1000fach höhere Konzentration von BS und DHE nötig, um die Adrenalinwirkung abzuschwächen und aufzuheben. In einem Fall konnte schon die 10fach höhere Konzentration von BS eine Abschwächung erzielen. Während die Wirkung von BS leicht auswaschbar war, hielt der Effekt des DHE 20—30 min an.

b) *Einfluß von BS auf den Arterenol-Effekt.* Die Wirkung von Arterenol ließ sich in derselben Weise durch BS aufheben, allerdings wurde die Amplitude nach Vorbehandlung mit BS niemals verringert.

c) *Einfluß von DHE und Ergotamin auf den Arterenol-Effekt.* DHE erzeugte in Konzentrationen wie BS eine Aufhebung des Arterenol-Effektes, allerdings trat nach Vorbehandlung mit DHE keine Verminderung der Amplitude durch Arterenol ein. Das Konzentrationsverhältnis von DHE zu Arterenol war 100 : 1—1000 : 1.

Ergotamin vermochte in mehreren Fällen weder die Adrenalinwirkung noch die Arterenolwirkung aufzuheben, selbst wenn es in 70—100mal höheren Konzentrationen gegeben wurde. In einem Fall hatte selbst eine 1000fach höhere Konzentration keinen Einfluß auf die Adrenalinwirkung.

3. Samenblase des Meerschweinchens.

Bis zu Konzentrationen von $1 : 10^4$ ließ sich keine Eigenwirkung des BS feststellen. Auf Adrenalin kontrahierte sich die Samenblase in Konzentrationen zwischen $1 : 5 \cdot 10^6$—$1 : 10^5$. Dieser Adrenalineffekt ließ sich durch BS in einem Verhältnis BS : Adrenalin = 20 : 1 abschwächen, in einem Verhältnis 100 : 1 völlig aufheben.

4. Samenblase des Goldhamsters.

In einem orientierenden Versuch war an der Samenblase des Goldhamsters durch BS in derselben Weise wie an der Samenblase des Kaninchens die fördernde Adrenalinwirkung aufzuheben.

5. Jejunum des Kaninchens.

BS bewirkte am Jejunum des Kaninchens in Konzentrationen von $1 : 10^5$—$1 : 10^6$ eine Senkung des Tonus bei erhaltener, unter Umständen verminderter Spontanrhythmik. In Konzentrationen $1 : 10^4$ trat ein völliger Stillstand für etwa 10 min ein. Nach dieser Zeit setzten langsam, bei vermindertem Tonus, die Spontanbewegungen wieder ein. Die Wirkung dieser Konzentration war der Wirkung nach Arterenol $1 : 5 \cdot 10^5$ bzw. Adrenalin $1 : 10^6$ gleich, so daß sich ein Verhältnis der Konzentrationen der 3 genannten Substanzen BS : Arterenol : Adrenalin $= 100 : 2 : 1$ ergibt. Eine Aufhebung der Adrenalinwirkung bzw. Arterenolwirkung durch BS war nicht zu erreichen.

6. Ileum der Ratte.

An diesem Organ hatte BS adrenalinähnliche Wirkung. Es wirkte in Konzentrationen von $1 : 10^5$—$1 : 5 \cdot 10^5$ erschlaffend, während die entsprechenden Adrenalineffekte schon bei $1 : 10^7$ lagen. Nur wenn BS eine Tonusherabsetzung erzeugte, konnte Adrenalin keinen weiteren Einfluß mehr ausüben. In 3 Versuchen wurde nach einer Tonussenkung durch $1 : 10^5$ BS die Wirkung von $BaCl_2$ $1 : 10^5$ aufgehoben. Nach dem Auswaschen zeigte $BaCl_2$ seine vorherige tonussteigernde Wirkung wieder.

7. Ratten-Uterus.

Am Uterus der Ratte bewirkte BS in Konzentrationen von $1 : 10^6$ eine Herabsetzung des Tonus bei erhaltener Spontanmotilität. Bei $1 : 10^7$ war die Wirkung noch geringer. Adrenalin in Konzentrationen von $1 : 10^7$ erzeugte einen vorübergehenden Stillstand, während ein solcher Stillstand mit starker Herabsetzung des Tonus nach BS erst bei $1 : 10^4$ bis $1 : 5 \cdot 10^5$ eintrat.

8. Uterus der Maus.

Die Befunde am Mäuseuterus waren denen am Rattenuterus sehr ähnlich. BS erzeugte in Konzentrationen von $1 : 10^7$ eine Hemmung der Spontanbewegung, bzw. einen vorübergehenden Stillstand. Adrenalin zeigte ähnliche, aber meist kürzere Wirkungen bei Konzentrationen von $1 : 10^8$.

9. Uterus vom Kaninchen.

Adrenalin erzeugte am Kaninchenuterus eine Kontraktion in Verdünnungen von etwa $1 : 9 \cdot 10^8$. Diese Kontraktionen ließen sich durch BS

in Verdünnungen $1 : 10^5$—$1 : 5 \cdot 10^5$ vollständig aufheben, während $1 : 10^6$ noch keine oder nur eine abschwächende Wirkung hatte.

Besprechung der Ergebnisse.

Die Versuche am Blutdruck zeigen, daß BS unter unseren Versuchsbedingungen regelmäßig eine blutdrucksenkende Wirkung hatte. Die Wirkung ließ sich über einen weiten Dosenbereich ohne toxische Nebenwirkungen erzielen. Wurde Adrenalin gleichzeitig mit BS gegeben, so war es möglich, die Adrenalinwirkung entweder abzuschwächen oder ganz aufzuheben. Die Folge war dann ein Gleichbleiben des Blutdruckes oder sogar ein Erhaltenbleiben der BS-Senkung. Allerdings war das Dosenverhältnis Adrenalin : BS in diesen Fällen 1 : 30000 und mehr. Sympatol ließ sich bereits bei einem Verhältnis 1 : 20 und darüber völlig aufheben. In diesen Fällen war es nicht möglich, durch vorherige Injektion von BS etwa eine Adrenalinumkehr wie nach DHE zu erzeugen. Es kommt in diesen Versuchen höchstens zu einem völligen Unwirksamwerden des Adrenalins. Die blutdrucksenkende Wirkung des BS zeigte sich auch bei Adrenalindauerinfusionen. Je höher die infundierte Adrenalin-Konzentration, d. h. der Ausgangsblutdruck, um so stärker war der senkende Effekt. Gerade dieser Einfluß mag sich bei klinischen Fällen von Hochdruck unter Umständen günstig auswirken.

Am Straubschen Froschherzen war die fördernde Wirkung des Adrenalins durch BS völlig zu beseitigen. In einigen Fällen ließ sich nach Vorbehandlung mit BS auf Adrenalin eine Verminderung der Amplitude, also sogar eine Umkehrwirkung beobachten. Dieser Effekt des BS entsprach völlig der DHE-Wirkung. Auch in der Größenordnung der Dosierung lagen beide hemmenden bzw. umkehrenden Substanzen gleich. Die Arterenol-Wirkung ließ sich durch BS wie durch DHE nicht umkehren. Die Versuche zeigen die Übereinstimmung des BS mit DHE und Ergotamin in bezug auf die adrenolytischen Wirkungen. Die Analogie der BS-Wirkung mit der DHE-Wirkung ließ sich auch an der Samenblase des Meerschweinchens sehr gut darstellen. Den Ergebnissen an der Samenblase des Meerschweinchens entsprachen die Versuchsergebnisse am Uterus des Kaninchens. Am Darm des Kaninchens und der Ratte sowie am Uterus der Ratte und der Maus hatte BS qualitativ adrenalinähnliche hemmende Wirkungen. In allen diesen Fällen ließen sich die Adrenalineffekte durch BS nicht aufheben.

Diese Versuche sprechen dafür, daß die Beziehungen des BS zum Adrenalin eine gewisse Ähnlichkeit mit denen von DHE zum Adrenalin haben, denn die Aufhebung der fördernden Adrenalinwirkungen ist sehr ähnlich; allerdings ist die Umkehrwirkung am Blutdruck durch BS nicht zu erzielen, sondern nur am Froschherzen. Vielleicht könnte man sich die Wirkung des BS so vorstellen, daß es imstande ist, Adrenalin

von den Rezeptoren der Zelle zu verdrängen. Entweder kann Adrenalin seine fördernden Wirkungen nicht ausüben, weil die Rezeptoren mit BS besetzt sind, so daß nur die hemmenden Wirkungen des kreisenden Adrenalins übrig bleiben, oder es bestände die Möglichkeit, daß BS auf Grund seiner nahen chemischen Verwandtschaft nur die hemmenden Wirkungen an Gefäßen, Darm usw. hätte, während die fördernden nicht ausgeprägt wären.

Zusammenfassung.

1. In Blutdruckversuchen an narkotisierten Hunden, Katzen und Kaninchen zeigte d,l,1-(4-oxy-phenyl)-1-oxy-2-n-butylamino-aethan (BS) eine blutdrucksenkende Wirkung. Durch gleichzeitige Gabe von BS wurde die blutdrucksteigernde Adrenalin-, Arterenol- und Sympatol-Wirkung abgeschwächt oder aufgehoben. Vorbehandlung mit BS schwächte die Wirkung der nachfolgenden Adrenalin-Injektion ab.

2. Am Straubschen Froschherzen vermochte BS in analoger Weise wie Dihydroergotamin (DHE) eine Aufhebung der fördernden Wirkung des Adrenalins zu erzielen, in einigen Fällen sogar eine Umkehr der Adrenalin-Wirkung.

3. Die Arterenol-Wirkung ließ sich durch BS und DHE in derselben Weise aufheben, aber nicht umkehren. Ergotamin konnte weder die Adrenalin- noch die Arterenol-Wirkung unter denselben Bedingungen aufheben.

4. An der Samenblase des Meerschweinchens und am Uterus des Kaninchens war es möglich, durch BS in derselben Weise wie durch DHE die Adrenalin-Wirkung völlig aufzuheben.

5. Am Jejunum des Kaninchens und am Ileum der Ratte zeigte BS hemmende adrenalinähnliche Wirkungen. Eine Aufhebung der Adrenalinwirkung war bei erhaltenem Tonus des Darmes nicht zu erreichen. Am Uterus der Ratte und der Maus zeigte BS gleichfalls hemmende Wirkungen. Die hemmenden Wirkungen des Adrenalin waren nicht aufzuheben.

Literatur.

[1] Duesberg, R.: Dtsch. med. Wschr. **1949**, 529. — [2] Unna, K.: Unveröffentlichte Versuche (siehe bei Duesberg). — [3] Lands, A. M., E. E. Rickards, V. L. Nash, and K. Z. Hooper: J. of Pharmacol. **1947**, 297. — [4] Marsh, D. F., and D. A. Herring: Arch. int. Pharmacodynamie **78**, 489 (1949). — [5] Brügger, J.: Helvet. phys. Acta **3**, 117 (1945). — [6] Rothlin u. Brügger: Helvet. phys. Acta **3**, 519 (1945).

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 31—35 (1950).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt.

Über die Beziehung des Darmstoffs zur Substanz „P“ I.

Von

WALTHER VOGT.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 17. August 1949.)

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es sich bei der von v. EULER und GADDUM entdeckten Substanz „P“[1] und dem „Darmstoff“[2] um den gleichen Körper handelt. Auf Grund verwandter Eigenschaften schien das zunächst wahrscheinlich[2]. Diese Frage war uns insofern wichtig, als im Falle der Identität die von anderen Autoren bereits gewonnenen Erkenntnisse über Subst. P mit denen über den Darmstoff kombiniert werden konnten. Im Falle der Verschiedenheit beider Stoffe mußten beim Vergleich die Merkmale hervortreten, die den einen Stoff vom anderen unterscheiden lassen und zur Erkennung des einen oder anderen dienen konnten.

Die Subst.-P-Präparate wurden nach Vorschrift von v. EULER[3] durch Auskochen von Pferdedärmen, Fällung der wirksamen Substanz aus der Kochbrühe mittels Ammoniumsulfat bei p_H 3—4, und Abtrennung von Begleitstoffen durch Zusatz von Alkohol bis 80% zu der in Wasser gelösten Ammonsulfatfällung[4] hergestellt. Die Darmstoffextrakte gewannen wir wie früher[2] aus Biodialysaten von Froschdärmen; die Bäder wurden im Vakuum zur Trockne gebracht, der Rückstand mit Chloroform extrahiert und der nach dem Abdampfen des Chloroforms zurückbleibende Wirkstoff in Wasser aufgenommen.

Zunächst wurden in 3 Versuchsreihen je eine Lösung von Substanz P (Präparate P_3, P_6, P_8 aus Pferdedarm) mit einem Darmstoffextrakt (Präparate E_1, E_2, E_4) an verschiedenen biologischen Objekten verglichen.

1. Vergleich P_3—E_1.

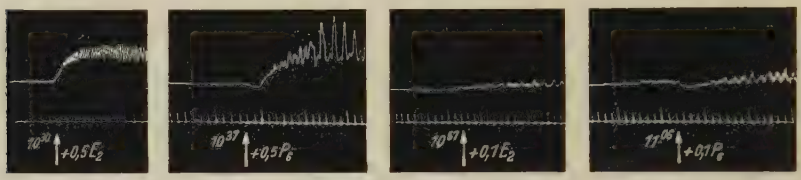
a) Froschrektum. 0,05 cm³ E_1 waren unwirksam, 0,1 cm³ wirkten erregend. 0,2 cm³ der Lösung P_3 wirkten noch nicht, 0,3 cm³ erregten das Rektum. 0,05 cm³ E_1 und 0,15 cm³ P_3, zusammengegeben, erregten ebenfalls. Die Lösung P_3 war also 3mal so schwach wirksam wie E_1. Unterschwellige Mengen des einen und des anderen Präparates addierten sich zu wirksamer Dosis.

b) Mäusedünndarm. Beide Lösungen wirkten hier annähernd gleichstark, E_1 war etwas wirksamer.

c) Meerschweinchendünndarm. Die genaue Austestung war infolge wechselnder Empfindlichkeit des Organs erschwert. E_1 schien etwas stärker zu sein als P_3 oder war gleich wirksam.

d) Trächtiger Meerschweinchenuterus. P_3 wirkte etwa 5 mal schwächer erregend als E_1.

e) Virgineller Meerschweinchenuterus. P_3 erregte gar nicht, sondern hemmte im Gegenteil die nach E_1 eintretende Erregung.



Biologischer Vergleich Subst. P (P_6) — Darmstoff (E_2). Versuche auf Abb. 1—3 unter Atropin 1:2 Mill.
Abb. 1. Ratten dünndarm (Tyrode), Zeit 10 sec.

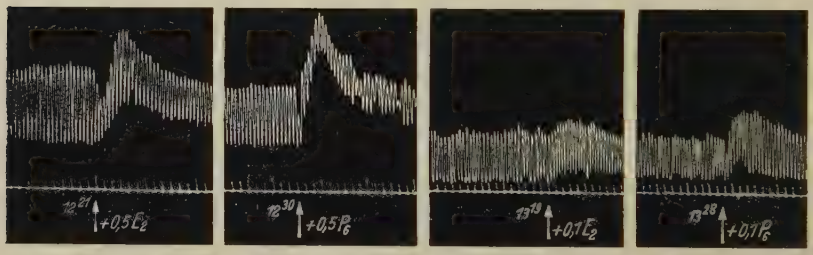


Abb. 2. Kaninchendünndarm (Tyrode), Zeit 10 sec.

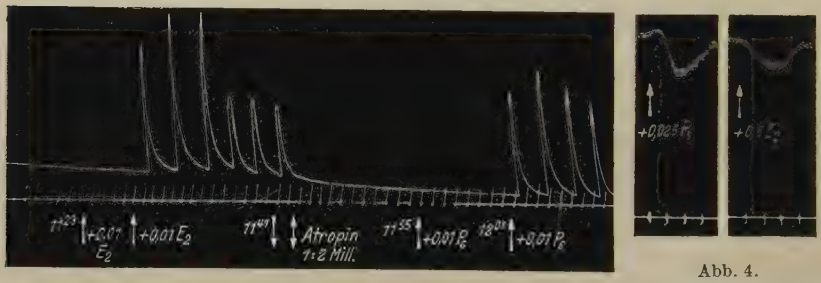


Abb. 4.

Abb. 3. Ausgewaschenes Froschrektum (Froschringer), ↓ = Spülen, Zeit 1 min.
Abb. 4. Kaninchenblutdruck, 2 mg/kg Atropin, Zeit 10 sec.

2. Vergleich P_6—E_2.

Am Froschrektum, Dünndarm von Kaninchen, Ratte und Maus und an der Kaninchenblase war das Wirkungsverhältnis etwa 1 : 1 (Abb. 1-3). Am trächtigen Meerschweinchenuterus fehlte bei P_6 jede erregende Wirkung, die nach E_2 eintretende Erregung wurde durch P_6 aufgehoben. Am Kaninchen in Urethan-Narkose wirkten — unter Atropin — beide

Extrakte blutdrucksenkend. P_6 war mehr als 20mal so wirksam wie E_2 (Abb. 4).

3. Vergleich P_8—E_4.

Am Froschrektum wirkte E_4 etwa 4mal so stark wie P_8. Am Kaninchenblutdruck dagegen erwies sich die P-Lösung als die wirksamere. Während 1 cm^3 E_4 den Blutdruck nur angedeutet senkte, fiel dieser bereits nach 0,25 cm^3 P_8 von 70 auf 40 mm Hg.

Ergebnis der Vergleiche.

Auf der einen Seite zeigte sich in den Versuchen eine recht gute quantitative Übereinstimmung in der Wirkung von Subst. P und Darmstoff, so am Darm verschiedener Tiere und an der Kaninchenblase. Andererseits bestanden aber auch erhebliche Unterschiede, nämlich am Meerschweinchenuterus und am Kaninchenblutdruck. Für das Fehlen einer erregenden Wirkung am Uterus war anscheinend das Vorhandensein eines Hemmfaktors, der in den P-Lösungen nachweisbar war, verantwortlich. Tatsächlich gewannen wir später auch Subst.-P-Präparate, die den virginellen Meerschweinchenuterus kräftig erregten (siehe weiter unten). Möglicherweise beruhte auch die relativ zum Darmstoff viel stärkere Blutdruckwirkung der Subst. P auf Begleitsubstanzen.

Um für diese Annahme Anhaltspunkte zu gewinnen, verglichen wir mehrere Präparate von Subst. P verschiedener Herkunft und Aufarbeitung untereinander. Wenn die unterschiedliche Wirkung von P und Darmstoff durch Verunreinigungen von P zustande kam, war zu erwarten, daß die verschiedenen P-Präparate, unter sich verglichen, den Blutdruck auch verschieden stark senken würden, bei Anwendung von Mengen gleicher Darmwirksamkeit.

Darstellung der zum Vergleich benutzten Präparate:

1. Hirn-P: Wäßrige Lösung eines nach der Eulerschen Methode aus dem Kochextrakt von zerriebenem Rinderhirn durch Ammonsulfatfällung und Reinigung mit Alkohol gewonnenen P-Stoffs.

2. Frosch-P: Lösung einer mittels der gleichen Methode dargestellten Subst. P aus Froschdärmen.

3. Pferdedarm-P:

a) Die eingeengte Kochbrühe von Pferdedarm wurde bei p_H 8 mit Kochsalz bis zur Sättigung versetzt, filtriert, Filtrat mit HCl bis p_H 3 angesäuert, wieder filtriert, alkalische und saure Fällung zusammen in Wasser gelöst, Alkohol bis 80% dazugegeben, die von der aufgetretenen Alkoholfällung befreite, klare Lösung neutralisiert, im Vakuum zur Trockne eingedampft, Rückstand in Wasser gelöst = Darm-P I.

b) Das saure Filtrat der Kochsalzfällung von 3a), das noch viel biologische Wirksamkeit enthielt, wurde mit gleichem Volumen gesättigter

Ammonsulfatlösung versetzt; nach 24 Std die Fällung abgetrennt, in Wasser aufgenommen, neutralisiert, Alkohol bis 80% dazugegeben, filtriert, das Filtrat eingeengt, das darin noch enthaltene Ammonsulfat mit Baryt entfernt. Die Lösung wurde dann bis zur Sirupkonsistenz eingeengt, mit 96%igem Alkohol mehrfach ausgezogen, zur alkoholischen Lösung das gleiche Volumen Äther zugefügt, filtriert, Filtrat zur Trockne eingedampft, Rückstand in Wasser aufgenommen = Darm-P II.

c) Einen Teil von Darm-P II mit Alkohol bis 80% versetzt, das 4fache Volumen Azeton zugefügt, von der Fällung abfiltriert, Filtrat eingedampft, den Rückstand in Wasser aufgenommen = Darm-P III.

d) Die Azetonfällung von 3c) getrocknet, in Wasser aufgenommen = Darm-P IV.

4. 100 mg eines von Herrn Prof. v. EULER freundlicherweise zur Verfügung gestellten Präparates P in 10 cm^3 Wasser suspendiert, von unlöslichem Bestandteil abfiltriert = $P_{\text{-Euler}}$*.

Die verschiedenen P-Lösungen wurden zunächst am Froschrektum, dann am Blutdruck des Kaninchens verglichen. Einige Extrakte wurden außerdem am virginellen Meerschweinchenuterus ausgewertet. Auf gleiche Blutdruckwirksamkeit bezogen, hatte die Lösung P_{Euler} die gleiche Darmwirksamkeit wie Darm-P IV, ein Fünftel der Darmwirksamkeit von Darm-P III und Hirn-P, ein Zwölftel der von Frosch-P und ein Fünfundzwanzigstel der von Darm-P I. Am Meerschweinchenuterus wirkten Hirn-P und Darm-P I kräftig erregend; die Erregung wurde durch Antistin 1 : 10 Mill., das die Wirkung von Histamin 1 : 5 Mill. unterdrückte, nicht beeinflußt. Frosch-P und Darm-P II erregten nicht, sondern hemmten die durch die anderen Extrakte hervorgerufene Erregung.

Aus diesen Versuchen war also ersichtlich, daß bei verschiedenen P-Präparaten zwischen Blutdruck- und Darmwirkung durchaus keine konstante Proportionalität bestand. Dem Darmstoff am ähnlichsten, d.h. relativ am geringsten blutdrucksenkend wirkte die Lösung Darm-P I. Aber auch dieser Extrakt war am Blutdruck noch wesentlich wirksamer als zum Vergleich herangezogene Darmstoffpräparate. Zweifellos beruht die darmerregende und die blutdrucksenkende Wirkung der Subst. P nicht nur auf einem einheitlichen Stoff, sondern in wechselnder Menge vorkommende Substanzen sind daran beteiligt. Es bleibt aber noch die Frage offen, ob es sich dabei im wesentlichen um *einen* Stoff handelt, dessen blutdrucksenkende — oder darmerregende — Wirkung durch Verunreinigungen beeinflußt wird, oder ob die beiden charakteristischen Wirkungen überhaupt auf 2 verschiedenen Substanzen beruhen. Im 1. Fall wären Darmstoff und Subst. P verschieden; das Unterscheidungsmerkmal läge in der relativ stärkeren blutdrucksenkenden Wirkung von P.

* Herrn Prof. v. EULER möchte ich auch an dieser Stelle für die freundliche Überlassung seines Präparats danken.

Falls die 2. Annahme richtig ist, wenn also die Subst. P aus einem blutdrucksenkenden und einem darmerregenden Faktor besteht, wäre der darmerregende als mit dem Darmstoff identisch anzusehen, denn die Wirkungen auf glattmuskelige Organe waren übereinstimmend. Der zu dieser Übereinstimmung nicht passende Befund am Meerschweinchenuterus findet dadurch seine Erklärung, daß in — nicht allen — P-Präparaten Hemmfaktoren vorhanden sind, auf die dieses Organ anscheinend besonders empfindlich reagiert. Ein tierspezifischer Unterschied kann nicht der Grund der Verschiedenheit von P und Darmstoff sein, da die aus Froschdärmen — dem Ausgangsmaterial für die Darmstoffpräparate — gewonnene Subst. P sich in ihrem Verhältnis Blutdruck- zu Darmwirkung wie andere P-Präparate und nicht wie der Darmstoff verhielt.

Zusammenfassung.

1. Die Wirkungen der Substanz P und des Darmstoffs auf verschiedene glattmuskelige Organe stehen im gleichen Verhältnis. Am Meerschweinchenuterus sichtbare Unterschiede können auf hemmende Begleitstoffe der Substanz P zurückgeführt werden.

2. Die blutdrucksenkende Wirkung der Subst. P ist, mit gleich darmwirksamen Mengen Darmstoff verglichen, wesentlich stärker als die des Darmstoffs.

3. Die biologischen Wirkungen der Substanz P beruhen nicht ausschließlich auf einem einheitlichen Stoff.

Literatur.

[1] Euler, v. and Gaddum: J. of Physiol. **72**, 74 (1931). — [2] Vogt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (D) **206**, 1 (1949). — [3] Euler, v.: Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **73**, 142 (1936). — [4] Euler, v.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (D) **181**, 181 (1936).

Dr. W. Vogt, Frankfurt a. M.-Süd, Pharmakolog. Institut, Weigertstraße 3.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol. Bd. 210, S. 36—38 (1950).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München.

Die Hämiglobin-Chloratreaktion*.

Von

MELCHIOR REITER.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 22. April 1949.)

Der Mechanismus der Chloratvergiftung ist von HEUBNER und JUNG als eine Hämiglobinkatalyse erkannt worden[2, 3]. Danach wird das Chlorat durch das dreiwertige Eisen des Hämiglobins katalytisch reduziert und anwesendes Hämoglobin dabei oxydiert. Handelt es sich hier um eine Anlagerung des Chlorat-Kations an das Hämiglobin nach Art einer Verbindung, wie es vom Hämiglobin mit Fluorid[6], Rhodanid[4], Cyanat[1] oder Cyanid[5] bekannt ist, wäre zu erwarten, daß sich diese Ver-

Abb. 1. Hämiglobin und Kaliumchlorat. Blaufilter (Schwerpunkt bei 492$\mu\mu$) Hämiglobinkonzentration: $0{,}3 \cdot 10^{-5}$ val/l, Chloratkonzentration: $2.5 \cdot 10^{-2}$ m/l · pH 6,9.

bindung durch eine eigene spektrale Absorption auszeichnet. Die Beantwortung dieser Frage erfordert eine besondere Versuchsanordnung, da eine dem Hämiglobin-Chlorat zukommende Farbänderung wegen der Reduktion des Chlorats nur vorübergehend auftreten dürfte.

Methodik: Das Hämiglobin wurde aus Pferdeblutkörperchen nach Hämolyse mit Toluol und anschließender Trennung von den Stromata durch Zusatz von $NaNO_2$ oder K_3FeCN_6 und nachfolgende Dialyse über einige Tage gegen Leitungswasser gewonnen. Die Lösung gab nach Ausflockung des Hämiglobins keine Trübung mit Silbernitrat. Sie wurde mit Phosphatpuffer zu 0,02 molarer Konzentration versetzt.

* Vorläufige Mitteilung. Die Untersuchung mußte aus äußeren Gründen für längere Zeit abgebrochen werden.

Zur photometrischen Untersuchung diente ein LANGE-Colorimeter, dessen Beleuchtungsstrom durch Eisenwasserstoffwiderstand und Glimmlampe stabilisiert wurde, so daß der Nullpunkt des Colorimeters ausreichend konstant war. In die beiden Vergleichsküvetten wurden Hämiglobinlösungen gleicher Konzentration gegeben. Nach Kompensation auf Null wurde gleichzeitig in eine Küvette $KClO_3$ und in die andere die gleiche Menge Wasser gespritzt, sofort umgerührt und dann der Meßkreis des Colorimeters eingeschaltet. Zur Messung diente ein Galvanometer mit der Stromempfindlichkeit von 10^{-9} Amp. Der Ausschlag des Galvanometers wurde photographisch registriert. Die Raumtemperatur betrug während der Versuche 19°.

Wie aus Abb. 1 hervorgeht, entsteht nach Chloratzusatz im blauen Spektralbereich (Filter mit Schwerpunkt bei 492 $\mu\mu$) eine Aufhellung gegenüber der reinen Hämiglobinlösung. Die Aufhellung beträgt größenordnungsmäßig 1—2%. Im Laufe von etwa 3 min geht bei p_H 6,9 die Absorptionsänderung wieder auf den Ausgangswert zurück. Die Rückbildungsgeschwindigkeit der Absorptionsänderung ist bei gleicher Temperatur abhängig vom p_H-Wert der Lösung. Sie nimmt zur sauren Seite hin zu.

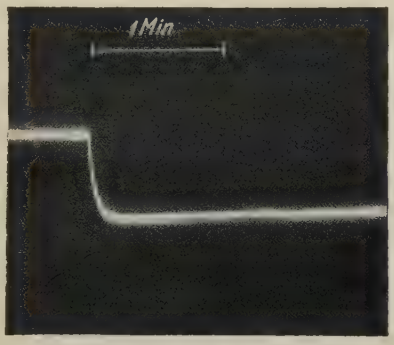


Abb. 2. Hämiglobin und Kaliumchlorid. Chloridkonzentration: $2{,}5 \cdot 10^{-2}$ m/l.

Während im blauen Spektralbereich die Ergebnisse davon unabhängig waren, ob das Hämiglobin durch einen Überschuß von $NaNO_2$ oder K_3FeCN_6 hergestellt war, hing das Ergebnis im roten Spektralbereich von der Herstellungsart des Hämiglobins ab. Bei dem mit K_3FeCN_6 gewonnenen Hämiglobin ergab sich hier keine verwertbare Abweichung von der Ausgangslinie nach Chloratzusatz. Bei dem mit $NaNO_2$ hergestellten Hämiglobin zeigte sich nach Chloratzusatz im roten Spektralbereich eine Verdunkelung, die im Laufe einiger Minuten auf den Ausgangswert zurückging. Der Grad der beobachteten Verdunkelung war etwas geringer als die Aufhellung im blauen Spektralbereich.

Beim Zusatz von Chlorid, Bromid und Jodid an Stelle des Chlorats zu der phosphathaltigen Hb(3)-Lösung ergab sich im blauen Spektralbereich eine Aufhellung, die von der gleichen Größenordnung war wie beim Chlorat, jedoch konstant blieb (Abb. 2).

Es ist anzunehmen, daß die auftretende Absorptionsänderung nach Chloratzusatz einer unbeständigen Hämiglobin-Chloratverbindung entspricht. Die schnellere Rückbildung der Absorptionsänderung im sauren p_H-Bereich als Ausdruck eines schnelleren Zerfalls der Verbindung stimmt mit der Tatsache überein, daß die Geschwindigkeit der Hämiglobinbildung durch Chlorat mit der H-Ionenkonzentration zunimmt[8, 7].

Daß Chlorid, Bromid und Jodid mit Hämiglobin konstante Farbänderungen hervorrufen als Ausdruck entsprechender Hämiglobinverbindungen, erscheint nicht verwunderlich. Diese Ionen haben auch einen hemmenden Einfluß auf die Hämiglobinbildung durch Chlorat[9]. Ihre hemmende Wirkung ist zwar nicht so stark, aber grundsätzlich ähnlich der Hemmung durch das Fluorid[9], dessen Hämiglobinverbindung ja schon lange bekannt ist[6].

Zusammenfassung.

Zusatz von Chlorat zu Hämiglobin ergibt eine vorübergehende Absorptionsänderung der Hämiglobinlösung, eine Aufhellung im blauen Spektralbereich. Der Befund wird gedeutet als Ausdruck einer spektrophotometrisch erfaßbaren Hämiglobin-Chloratverbindung.

Chlorid, Bromid und Jodid ergeben mit Hämiglobin eine konstante Aufhellung im blauen Spektralbereich.

Literatur.

[1] Hecht, G.: Biochem. Z. **305**, 290 (1940). — [2] Heubner, W., u. F. Jung: Schweiz. med. Wschr. **1941**, 27. — [3] Heubner, W., u. F. Jung: Ber. Dtsch. chem. Ges. **75**, 1636 (1942). — [4] Jung, F.: Biochem. Z. **304**, 37 (1940). — [5] Kobert, R.: Über Cyanhämoglobin und den Nachweis der Blausäure. Stuttgart: Ferdinand Enke 1891. — [6] Lipmann: Biochem. Z. **206**, 171 (1929). — [7] Mayer, R. L.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. **95**, 375 (1922). — [8] Mering, v.: Das chlorsaure Kalium. 1885. — [9] Reiter, M.: Inaug.-Diss. Berlin 1944.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol. Bd. 210, S. 39—48 (1950).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. Franz Volhard).

Zur Pathologie der roten Blutzelle.

Über Veränderungen der unreifen Blutzellen des primären hämolytischen Ikterus bei experimenteller Nitritvergiftung.

Von

Peter Moser.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 13. Juli 1949.)

Die spezielle Zellform der artspezifischen roten Blutzelle der Laboratoriumstiere ist von Bedeutung für die Wirkung eines Oxydationsmittels, welches unter experimentellen Bedingungen in vivo auf das Blut einwirkt.

Die Wirkung eines Oxydationsmittels auf rote Blutzellen erkennt man an 2 charakteristischen Veränderungen der Zelle. 1. An einer Oxydation der chromophoren Gruppe des Hämoglobins mit einem Farbwechsel von rot nach braun und 2. an einer herdförmigen Denaturierung des Zelleiweißes der Zelloberfläche (Heinzkörperchen). Die Farbveränderungen der prosthetischen Gruppe sind reversibel, die Zelle als solche bleibt erhalten. Die Schädigung der Zelloberfläche hat die vorzeitige Eliminierung der Zelle aus der Blutbahn und eine Anämie zur Folge (Heubner, v. Issekutz, Jung, Wilhelmi, Kiese u. a.). Die Wirkung von Natriumnitrit auf die Erythrozyten normaler Menschen in vivo wurde von uns untersucht und festgestellt, daß eine Oxydation an der Zelle im wesentlichen einer Oxydation am Blutfarbstoff gleichzusetzen ist, d. h. es wird in einer der angewandten Nitritmenge äquivalenten Menge Hämiglobin gebildet. Es treten keine Heinzkörperchen auf. Die Reduktion des oxydierten Blutfarbstoffes durch den Stoffwechsel der reifen Zelle ist beim Menschen innerhalb von 12—24 Std vollendet, während die Funktion der ganzen Zelle, gemessen an der Kohlensäurebindung, der osmotischen Resistenz, dem Gehalt an Karboanhydrase und dem Verhalten des leicht abspaltbaren Bluteisens Barkans noch nicht völlig wiederhergestellt ist. Diese Funktionen kehren jedoch bei der reifen Zelle innerhalb von 4—8 Tagen zu den Werten, welche vor Beginn des Versuches bestanden, zurück. Die Zelle verbleibt innerhalb der Blutbahn und es entsteht keine Anämie.

Ausgehend von der Überlegung, daß die rote Blutzelle in ihrer „Ontogenese" verschiedene Stadien der Reife durchläuft, welche sich durch einen quantitativ oder qualitativ geringeren Hb-Gehalt auszeichnen, und daß andererseits die Hämoglobinmenge der einzelnen Zelle in ihrem mengenmäßigen Verhältnis zum Nichthämoglobineiweiß einen determinierenden Einfluß auf die Zellform ausübt, wurde die Wirkung von Natriumnitrit bei Kranken mit den Zeichen einer starken Regeneration des roten Blutbildes untersucht.

Es ist klar, daß Menschen, welche eine akute Blutungsanämie erleiden und als Folge des Blutverlustes eine starke Regeneration des Blutes aufzeigen, am ehesten

für eine Untersuchung der jugendlichen Zellen in Frage kommen. Es ist jedoch ebenso klar, daß eine Untersuchung, welche in der oft sehr bedrohlichen Situation einer akuten Blutungsanämie für den Kranken nicht zum Nutzen ist, sich von vornherein verbietet.

Unsere Untersuchungen wurden an Kranken mit primärem hämolytischen Ikterus ausgeführt, welche bei einem gesteigerten, an der Retikulozytenzahl geschätzten Blutumsatz an diesen Zustand adaptiert schienen. Es erhebt sich hier sofort der Einwand, daß bei diesen Kranken eine Abart der roten Blutzelle (Sphärozyten) und ein pathologischer Reifungsprozeß vorliegt, welcher von vornherein mit der normalen Blutregeneration nicht vergleichbar sei.

Dazu ist folgendes zu bemerken: Zur Charakterisierung der Jugend der roten Blutzellen kennen wir die Polychromasie und den Nachweis der Substantia granulofilamentosa (Retikulozyten), welche morphologisch von SEYFARTH, CESARIS-DEMEL, ENGEL, HEILMEYER u. v. a. nach ihrem Phänotypus in bestimmte Gruppen eingeteilt wurden. Weiterhin den physikalischen Nachweis der Rotfluoreszenz (Porphyringehalt) (BORST und KÖNIGSDÖRFFER, SEGGEL und KELLER), die bei stark regenerierenden Anämien besonders nach bereits abgeschlossenem Retikulozytenstadium in der einzelnen Zelle als Zeichen eines mangelhaften Eiseneinbaues ins Hämoglobin auftritt. Chemisch lassen sich die jungen Blutzellen durch den Nachweis von Kernphosphorsubstanzen (P. F. MEYER), durch einen höheren Gehalt an Magnesium (BANG und ØRSKOV) und durch den Gehalt an Ribonukleinsäure (LAVES u. Mitarb.) von älteren Zellen abgrenzen. Biologisch haben die jungen Zellen eine schwächere oder fehlende Agglutinabilität. Ferner weiß man seit den Untersuchungen von MORAWITZ, daß jugendliche rote Blutzellen eine gesteigerte „Sauerstoffzehrung" als Ausdruck eines noch bestehenden Oxydationsstoffwechsels besitzen. Ohne auf die Frage eingehen zu wollen, ob es sich bei den Sphärozyten des primären hämolytischen Ikterus (pr. h. I.) um eine konstitutionelle Eigenschaft der Zelle handelt oder um einen unter dem Einfluß des Retikuloendothels und der Milz veränderten Reifungsprozeß der primär „normal" gebildeten Zelle, oder um einen pathologischen Regenerationstyp, so ist das Gemeinsame in jedem Falle die Unreife der Zelle.

Die Eigenschaft der prosthetischen Gruppe des Hämoglobins, von der zweiwertigen in die dreiwertige Stufe überzugehen, benutzten wir als ein Charakteristikum des reifen Hämoglobins und untersuchten das Verhalten von Erythrozytenpopulationen mit Zeichen chronischer Regeneration (5—10% Retikulozyten) auf einen oxydativen Eingriff mit Nitrit, über das im folgenden berichtet werden soll[1].

Den Kranken mit pr. h. I. wurden intravenös 300—900 mg Natriumnitrit in 10%iger Lösung appliziert und in zeitlichen Abständen Hämoglobin, Hämiglobin, Erythrozytenzahl und Hämatokritwert bestimmt. Gleichzeitig wurde die Gasbindung, die Aktivität des Fermentes Karboanhydrase, das „leicht abspaltbare Bluteisen", die Permeabilität der Zelle für schnell eindringende Molekeln, und die osmotische Resistenz untersucht. Wegen Einzelheiten der Methodik verweisen wir auf die vorhergehende Arbeit.

[1] Bezüglich der Methodik wird auf die im gleichen Band S. 60 aus drucktechnischen Gründen später erscheinende Arbeit hingewiesen.

Wir verwenden im folgenden den Ausdruck „junge, unreife Zellen" immer für unsere Ergebnisse bei Kranken mit pr. h. I., welche eine Dauerretikulozytose aufwiesen. Diese Dauerretikulozytose dient jedoch nur zur Abschätzung der gesteigerten Blutbildung, d. h. der Jugend der Zellpopulation. Die Jugend der Zellen und der Begriff der jungen, unreifen Zellen beschränkt sich aber nicht auf die Retikulozyten, sondern umfaßt unserer Definition nach auch die porphyrin-haltigen rotfluoreszierenden Zellen, d. h. alle Zellen, welche in geringerem Grade biologisch aktives Eisen in der prosthetischen Gruppe des Hämoglobins enthalten.

Bei Nitritbelastung von Kranken mit pr. h. I. zeigten sich nun im Gegensatz zum Verhalten bei normalen Versuchspersonen 2 bemerkenswerte Tatsachen: 1. Es wurde weit weniger Hämiglobin gebildet, als der angewandten Nitritmenge nach zu erwarten war. Die Werte lagen fast immer erheblich unter den Werten der Dosiswirkungskurve von Normalpersonen (vgl. Abb. 1). Während der Hämiglobinämie und ihrer Rückbildung innerhalb von 24 Std kam es zu keiner Verminderung der Zellzahl. 2. Jedesmal trat zwischen dem 3. und 9. Tag nach der Nitritgabe eine typische hämolytische Krise auf, zu einer Zeit also, in der das gebildete Hämiglobin bereits wieder zu Hämoglobin reduziert worden war (vgl. Abb. 2). Während die Hämiglobinbildung bei normalen Versuchspersonen einen linearen Verlauf zeigt, weist die geringere Hämiglobinbildung beim pr. h. I. eine stärkere Streuung auf. Das Ausmaß des sich an die Oxydation anschließenden maximalen Zellzerfalls in der hämolytischen Krise zeigt dagegen keine Proportionalität zur Nitritdosis. Dagegen fand sich folgende wichtige Relation: Je größer die Zeichen der Regeneration des Blutbildes waren, je geringer war die Farbveränderung am Hämoglobin, desto größer jedoch der Zellzerfall in der sich anschließenden hämolytischen Krise. Umgekehrt, je geringer die Zeichen der Regeneration des Blutbildes — geschätzt an der Retikulozytenzahl —, desto höher war die Hämiglobinbildung, desto geringer jedoch der sich an die Oxydation anschließende Zellzerfall. Daraus ist zu schließen, daß die Wirkung der

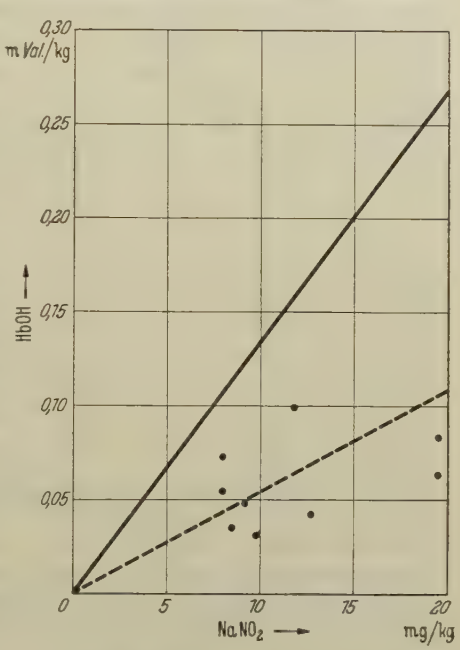


Abb. 1. Dosiswirkungskurve — — — bei Fällen von primärem hämolytischen Ikterus. (Die ausgezogene Linie entspricht der Dosiswirkungskurve beim Normalen.) Die Umsetzung Val Hämoglobin : Mol $NaNO_2$ erfolgt im Verhältnis 0,4 : 1!

salpetrigen Säure vom Reifungszustande, respektive vom Alter der Zelle abhängt. Je jünger die Zellen sind, je weniger reifes Hämoglobin, d. h. eisenhaltige Häme sie besitzen, je weniger eine Oxydation der prosthetischen Gruppen überhaupt möglich ist, desto eher gehen sie zugrunde. Es scheint uns natürlich, aus der Tatsache des Zelluntergangs eine Wirkung der salpetrigen Säure auf das Zelleiweiß der unreifen Zelle zu erschließen, obwohl keine Veränderung der Zelloberfläche mikroskopisch festgestellt werden konnte. Heinzkörperchen wurden nach Anfärben mit Brillantkresylblau nach 24 Std in der feuchten Kammer ganz vereinzelt gesehen. Ihr Ausmaß erklärt jedoch nicht im Entferntesten den Zelluntergang. Man könnte die Annahme machen, daß durch salpetrige Säure am Plasmaeiweiß oder am Retikuloendothel eine Veränderung ausgelöst wird, die ihrerseits einen Hämolysemechanismus in Gang setzt. Bei der direkten Wirkung auf die Zelle, die viele Parallelen im Tierexperiment hat, ist diese Annahme unserer Ansicht nach von untergeordneter Bedeutung. Entscheidend für die Art der Wirkung des Oxydationsmittels erscheint in jedem Falle der physikalische Zustand der Zelle zu sein.

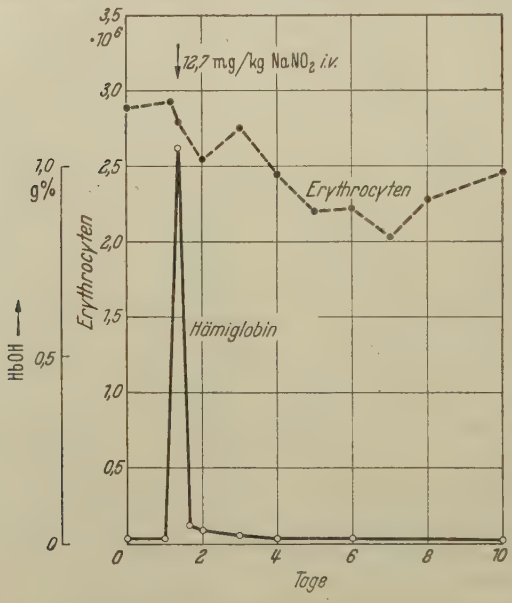


Abb. 2. Hämolytische Krise nach Natriumnitrit bei einer 34jährigen Patientin mit primärem hämolytischen Ikterus. Hämiglobin ist in % des Gesamthämoglobins angegeben.

O_2-*Bindung:* Die Sauerstoffbindungskurve zeigt bei verschiedenen O_2-Drucken bei unseren Fällen pr. h. I. eine Verminderung der Sauerstoffkapazität auf der Höhe der Hämiglobinbildung. Die Verminderung der O_2-Kapazität entspricht dem auf das Gesamthämoglobin bezogenen Hämiglobinwert, jedoch bestand keine so gute Übereinstimmung wie bei den Normalpersonen. Gegenüber der O_2-Dissoziationskurve des Normalen fand sich ein flacher Verlauf im Bereiche niederen Druckes, welcher weitgehend der O_2-Dissoziationskurve von Hämoglobinlösungen mit hohem Elektrolytgehalt entsprach. Die Kranken mit pr. h. I. zeigten spektrophotometrisch, wie in der Gasbindung eine langsamere Rückbildung des Hämiglobins als Normalpersonen. Diese langsame Rück-

bildung war bei einem Fall nach der Milzexstirpation auch noch deutlich, als das Blutbild sich gebessert hatte und nur noch 8‰ Retikulozyten aufwies. Die Hämiglobinbildung entsprach nach der Milzexstirpation völlig dem Verhalten beim Normalen, es trat keine hämolytische Krise mehr auf. Die Sphärozytose dieses Falles zeigte dabei eine mittlere Erythrocytendicke von 2,3 μ gegenüber 2,9 μ bei der Untersuchung vor der Milzexstirpation. Die Gasanalyse bei Fällen von pr. h. I. zeigte jedoch eine Besonderheit, welche wir nicht befriedigend erklären können. Auf der Höhe der Hämiglobinämie und am folgenden Tag wurde bei Normalpersonen bei einem O_2-Druck von 150 mm immer ein erhöhter Wert für das Restgas in der Kammer gefunden. Dieser betrug im Durchschnitt 1—2 Vol%. Man kann vermuten, daß es sich bei dieser geringen Erhöhung des Restgases in der Kammer um eine gewisse Menge Stickoxyd handelt, welche als Folge der Nitritwirkung neben dem Stickstoff auftritt. Bei pr. h. I. mit einer Retikulozytose von 10% fand sich nun auf der Höhe der Hämiglobinämie ein Restgas von 2—4 Vol%. Das Auffallende war jedoch, daß die Restgasmenge am höchsten war, wenn die Hämiglobinbildung — auch bei photometrischer Messung — am geringsten war. Da wir die geringere Hämiglobinbildung durch eine echte Hypochromie der Zellen deuten, welche nicht genügend oxydierbare eisenhaltige Häme enthalten, so ist die Annahme, daß es sich bei der Vermehrung des Restgases um Stickoxyd handeln könnte, unwahrscheinlich.

p_H *der Zelle:* Im Gegensatz zu dem Verhalten der Erythrozyten von normalen Versuchspersonen findet man bei den unreifen Zellen des pr. h. I. auf der Höhe der Hämiglobinämie keine oder nur eine sehr geringfügige Abnahme des Kohlensäurebindungsvermögens bei verschiedenen CO_2-Drucken. Auch in den folgenden Tagen im Abklingen der Hämiglobinämie findet sich keine Verringerung des Kohlensäurebindungsvermögens.

Bei normalen, reifen Blutzellen wird das sich spontan oder durch Oxydation (Nitrit) bildende Hämiglobin durch die Hämiglobinreduktase und die als Endprodukt der Glykolyse in der Zelle entstehende Milchsäure reduziert, wobei eine äquivalente Menge Brenztraubensäure gebildet wird (Kiese). Gleichgültig ob die Ketosäure unter Mitwirkung der Karboxylase dekarboxyliert wird oder nach Krebs durch eine mit Kohlensäureabspaltung verbundene Oxydoreduktion in Essigsäure und Milchsäure überführt wird, belegt die plötzliche Vermehrung der Keto- oder Oxysäuren mit ihren relativ hohen Dissoziationskonstanten einen Teil des Blutalkali und das Kohlensäurebindungsvermögen vermindert sich. Bei den unreifen Zellen kommt es zu einer sehr viel geringeren oder zu keiner Oxydation am Häm, infolgedessen auch zu keiner gleichartigen Stoffwechselleistung wie bei der reifen Zelle. Eine Verdrängung der gebundenen Kohlensäure in der Zelle findet nicht statt. Daher erklärt sich die fehlende Verminderung des Kohlensäurebindungsvermögens — wobei wir an eine Bindung als Proteinbikarbonat denken — der unreifen Zellen einerseits durch das Fehlen des eisenhaltigen Pigmentes und seiner „linked functions“ und andererseits durch das Fehlen eines Restitutionsstoffwechsels. Es ist wahrscheinlich, daß die Glykolyse in gleicher Weise zunimmt, wie die Reifung des Hämoglobins sich vollzieht.

Permeabilität und osmotische Resistenz: Das Kohlensäurebindungsvermögen ist ein mittelbarer Ausdruck für den Elektrolytgehalt der Zelle, d. h. für den osmotischen Druck. Da das Kohlensäurebindungsvermögen im Laufe der auf das Maximum der Hämiglobinämie folgenden Tage nicht absinkt, so ist zu erwarten, daß auch die osmotische Schwellung der Zellen sich nicht ändert. Dies ist auch der Fall. Prüft man im osmotischen Schwellungsversuch die Geschwindigkeit des Eindringens von Wasser in die unreifen Zellen, so ist die Geschwindigkeit gegenüber Normozyten verändert. Sie ist jedoch vor, während und nach der Hämiglobinämie in den untersuchten NaCl-Konzentrationen gleich und zeigt einen maximalen Volumzuwachs, respektive den Schwellungsbeginn jeweils in der gleichen Grenzkonzentration. Dies heißt, daß der osmotisch wirksame Inhalt der Zelle sich nicht geändert hat. In zusammen mit CNYRIM durchgeführten Versuchen war die Geschwindigkeit des Eindringens von Wasser bei unreifen Zellen in den ersten Sekunden beschleunigt, das Volummaximum wird dagegen in der Zeiteinheit bei beliebiger Hypotonie des Außenmediums später erreicht als bei Normozyten. Die Zellen streben einem anderen Gleichgewichtsvolumen zu. Es kann in Analogie hierzu geschlossen werden, daß salpetrige Säure langsamer in die Zelle eindringt. Doch ist hierdurch die geringere Oxydierbarkeit des Blutfarbstoffes der unreifen Zellen nicht hinreichend befriedigend erklärt.

Auch im osmotischen Hämolyseversuch (Resistenz) war bei etwas weniger steilem mittleren Verlauf der Kurve keine Änderung vor, während und nach Abklingen der Hämiglobinämie nachzuweisen. Bei 50% Hämolyse zeigte sich eine geringe Verschiebung nach links, d. h. in Richtung geringerer Molarität des Außenmediums. Nach Abklingen der Hämiglobinämie war im Bereich geringerer Molarität des Außenmediums eine Resistenzzunahme festzustellen. Sie war jedoch im Vergleich zu den Werten bei Normalpersonen geringfügiger. Dagegen zeigt die Kurve im Bereiche größerer Molarität der Außenlösung eine gegenüber den Werten bei Normalpersonen deutlich vermehrte Hämolyse. Diese Verminderung der Resistenz geht in das Stadium der hämolytischen Krise über.

Die Änderung des osmotisch wirksamen Inhaltes der Zelle, gemessen am spezifischen Gewicht des Gesamtblutes trat bei den unreifen Zellen nach Nitritgabe nicht ein. Das spezifische Gewicht des Serums zeigte keine entsprechende Erniedrigung, wie sie bei normalen Versuchspersonen beobachtet wird. Cl-Ionen und Alkalireserve des Serums zeigten keine signifikanten Schwankungen.

Karboanhydrase: Die Aktivität des nicht an die Struktur der Zelle gebundenen Fermentes Karboanhydrase zeigte auf der Höhe der Hämiglobinämie und in den folgenden Tagen in gleicher Weise wie beim Normalen eine Hemmung.

„*Leicht abspaltbares Bluteisen*“: Das leicht abspaltbare Bluteisen zeigte auf der Höhe der Hämiglobinämie nur eine sehr geringfügige Verminderung um etwa 10% des Ausgangswertes, und schwankte in den folgenden Tagen beträchtlich. Tritt die hämolytische Krise ein, so ist die Hemmung der Eisenabspaltung aus dem Vollblut stärker. Sie beträgt 30—40% des Ausgangswertes bei Berücksichtigung des Zellverlustes. Mit dem Einsetzen der Regeneration nach der Krise steigt auch der Wert des leicht abspaltbaren Bluteisens wieder. Das Serumeisen zeigt ebenfalls beträchtliche Schwankungen. Es verhält sich umgekehrt proportional dem leicht abspaltbaren Bluteisen, wie es früher zusammen mit Krause beschrieben wurde.

Die morphologischen Veränderungen des Blutbildes, besonders die im Nativpräparat und im fixierten Ausstrich sichtbaren Schwankungen des Zelldurchmessers und der Anfärbbarkeit entsprechend den Befunden, wie sie allgemein bei hämolytischer Krise, so insbesondere bei experimenteller Immunhämolyse des Meerschweinchens (Damashek und Schwartz) bekannt sind. Die Zeitdauer bis zum Eintreten der hämolytischen Krise und bis zum Tiefpunkt des Erythrozytenabfalls war bei unseren Fällen nicht immer gleich. Dies könnte darauf hindeuten, daß neben der Oxydation an der Zelle noch weitere Faktoren eine Rolle spielen.

Es wäre noch ein Symptom zu erwähnen, welches beim pr. h. I. von den Kranken fast ausnahmslos in wechselnder Stärke angegeben wurde und welches man am besten als „Muskelkatersymptom“ bezeichnen könnte. Die Pat. klagen auf der Höhe der Hämiglobinämie und in den folgenden Tagen über Schmerzen in der Muskulatur. Meist wurden ziehende Schmerzen in der Peroneusmuskulatur, sehr häufig auch in den Oberschenkeln angegeben, besonders, wenn der Pat. zum erstenmal nach der bei Bettruhe ausgeführten Belastung aufstand. Die Schmerzen treten aber auch bei Bettruhe auf. Bei normalen Versuchspersonen wurde dieser ziehende Muskelschmerz nicht beobachtet, sondern es wurde nur über die immer wieder sehr gleichmäßig angegebenen geringen Kopfschmerzen, sowie über Leichtigkeit, Müdigkeit oder eine „innere Schwäche“ geklagt. Cash und Dunstan, sowie Leech beschrieben, daß unter Nitritwirkung der ruhende quergestreifte Muskel sich verkürzt und in eine Starre übergeht. Ein Teil Natriumnitrit in 5000 Teilen physiologischer Salzlösung gelöst, verkürzt die Dauer der Kontraktionsfähigkeit des suspendierten quergestreiften Muskels beträchtlich. Nach den hier beschriebenen Unterschieden im Elektrolytgehalt, bzw. im osmotisch wirksamen Inhalt von reifen und unreifen Zellen (Sphärozyten) könnte man ähnliche Verhältnisse an den Muskelfasern erwarten. Die Fähigkeit zur Ferrimyoglobinbildung könnte Unterschiede zeigen, was in analoger Weise Änderungen im osmotisch wirksamen Inhalt der Faser zur Folge hätte, auf deren Bedeutung für die Erregung und Kontraktion Fleckenstein und Hertel hingewiesen haben.

Diskussion der Befunde.

Man könnte die Möglichkeit diskutieren, ob unreife Zellen beim pr. h. I. des Menschen einen größeren Reichtum an reduzierenden Fermentsystemen besitzen und aus diesem Grund eine geringere Hämiglobinbildung auftritt. Dagegen spricht jedoch das auch bei geringer Hämiglobin-

bildung verzögertes Abklingen der Hämiglobinämie. Die Tatsache, daß bei *reifen* Zellen nach Überschreiten des Maximums der Hämiglobinämie die p_H-Verschiebung in der Zelle noch weiter schreitet, weist auf die maßgebliche Rolle des Zellstoffwechsels für die Regulation des osmotischen Inhaltes hin. Die fehlende Änderung des osmotischen Inhaltes bei den *unreifen* Zellen kann man als eine Folge der fehlenden Oxydation am Häm ansehen. Der Grund, eine „Akkumulation" von salpetriger Säure an das Zelleiweiß anzunehmen, liegt in der nach einer Latenz von 2 bis 9 Tagen zu beobachtenden hämolytischen Krise. Es wäre denkbar, daß die salpetrige Säure an den Aminogruppen des Eiweisses angreift, wobei pro Aminogruppe eine Hydroxylgruppe entsteht und analog der Bestimmung der freien Aminogruppen nach v. SLYKE Stickstoff frei wird. Es ließe sich dann das erhöhte Restgasvolumen bei der Gasanalyse als Stickstoff erklären, zumal nach CONANT und SCOTT eine Adsorption des Stickstoffs an das Eiweiß möglich wäre. Da eine Denaturierung des Eiweißes der Zelloberfläche (Heinzkörperchen) bei manchen Laboratoriumstieren einen beschleunigten Abbau dieser Zelle zur Folge hat und da als Folge eines oxydativen Eingriffs am Zelleiweiß unreifer Blutzellen des Menschen ein Zellzerfall nachzuweisen ist, so ist wahrscheinlich, daß es sich um prinzipiell gleiche, jedoch nur graduell verschiedene Vorgänge handelt. Es mag offen bleiben, ob eine lokale Denaturierung im Sinne eines Heinzkörperchens die für die Lebensdauer der Zelle „günstigere" Form der Oxydation darstellt. Es ist unserer Ansicht nach möglich, daß Zellen mit größerem sphärischen Index weniger Hämiglobin und eher Heinzkörperchen bilden. In dieser Hinsicht gewinnt die von RIMINGTON und QUIN beschriebene Nitritvergiftung südafrikanischer Schafe, die „Tribulose" eine besondere Bedeutung, da hier mit hoher Wahrscheinlichkeit eine akute hämolytische Anämie als Folge der Nitritvergiftung auftritt. Der nach einigen Tagen bei den Tieren auftretende Ikterus braucht unserer Ansicht nach nicht gegen die Annahme einer Nitritwirkung auf die Blutzellen zu sprechen. Er ist die Folge einer hämolytischen Krise, welche bei einem Durchmesser der Schaferythrozyten von 4,8 μ und einem mittleren Volumen von 30 μ^3 ihre Ursache in den speziellen Zelldimensionen hat.

Es wäre für die Pathogenese der Heinzkörperchen wichtig, die Frage der speziellen Zellform als Voraussetzung morphologisch verschiedener Koagulationen näher zu untersuchen. Wir haben die Ansicht, daß die Verteilung reifen Hämoglobins zum Nichthämoglobineiweiß in der einzelnen Zelle die spezielle Zellform bestimmt. Zellen, welche weniger Hb-Moleküle pro Zelloberfläche, aber relativ mehr Hb-Moleküle pro Zelle besitzen, haben bei gleichen Quotienten Hb/Volumen nach den ABDERHALDENschen Anyalsen mehr Nichthämoglobineiweiß in Bezug auf das Hämoglobin. Sie haben einen höheren sphärischen Index. Das Gemein-

same der Wirkung salpetriger Säure bei Erythrozyten verschiedener Spezies ist die Zellschädigung, welche mit oder ohne sichtbare herdförmige Koagulation von Oberflächeneiweiß einhergeht und mit dem weiteren Bestehen der Zelle in der Blutbahn nicht vereinbar ist. Es ist aus unseren, oben mitgeteilten Befunden der zwingende Schluß zu ziehen, *daß es im wesentlichen die jungen, unreifen Zellen sind, welche nach der Oxydation zugrunde gehen.* Es ist mit dieser Anschauung möglich, in der Literatur bestehende Divergenzen über Befunde von Heinzkörperchen, wie z. B. die widersprechenden Befunde Moeschlins gegenüber Heubner und Pulina, auf solche Unterschiede in der Reife der Erythrozytenpopulation zurückzuführen.

Die Wirkung von Natriumnitrit erscheint in unseren Versuchen ein grobes Modell der feineren ursächlichen Vorgänge zu sein, welche beim pr. h. I. des Menschen eine „spontane" hämolytische Krise auslösen und der prinzipielle Vergleich erscheint erlaubt. Der Einbau des Eisenatoms in die prosthetische Gruppe des Hämoglobinmoleküls und die erst dann erworbene Fähigkeit des Moleküls, mehrere Funktionen, welche miteinander gekoppelt sind, zu gewinnen, erscheint als wesentlicher Markstein in der Entwicklung der roten Zelle. Es ist bemerkenswert, daß dieser Einbau bei Fällen von hämolytischem Ikterus erst in der Peripherie zum Abschluß kommt.

Zusammenfassung.

1. Intravenöse Gaben von 300—900 mg Natriumnitrit bei Fällen von primärem hämolytischem Ikterus mit einer starken Vermehrung jugendlicher Erythrozyten im peripheren Blute erzeugen eine Hämiglobinbildung in diesen Zellen, die weit unterhalb der Dosiswirkungskurve des Normalen liegt. Die geringere Hämiglobinbildung wird durch die Unreife der Zellen, d. h. durch einen Mangel an eisenhaltigen oxydierbaren Hb-Molekülen erklärt.

2. Als Folge der Nitritwirkung kommt es beim primären hämolytischen Ikterus im Gegensatz zu Normalpersonen nach 3—9 Tagen zu einer hämolytischen Krise.

3. Es wird erörtert, daß eine wechselseitige Relation in der Wirkung des Nitrits einerseits auf die prosthetische Gruppe des Hämoglobins und andererseits auf das Oberflächeneiweiß der Zelle besteht: Je geringer die Oxydation der prosthetischen Gruppe, desto größer die Wirkung auf das Zelleiweiß, gemessen am quantitativen Blutzerfall. Es tritt keine morphologische Oberflächenveränderung im Sinne der Heinzkörperchen als Voraussetzung des Zellunterganges auf. Es wird vermutet, daß der den Zellzerfall einleitende Angriff des Oxydationsmittels an den Aminogruppen des Zelleiweißes ansetzt.

4. Aus der Unveränderlichkeit der Permeabilität für schnell eindringende Moleküle wird auf die Unveränderlichkeit des osmotischen

Inhalts geschlossen. Die Permeabilität für Hämoglobin zeigt in den dem Maximum der Hämiglobinämie folgenden Tagen im Bereich geringerer Molarität des Außenmediums eine Verminderung, im Bereiche größerer Molarität dagegen eine Erhöhung.

5. Die Aktivität des Fermentes Karboanhydrase wird in gleichem Grade gehemmt wie bei Normalpersonen. Die Hemmung ist am stärksten auf dem Maximum der Hämiglobinämie.

6. Das leicht abspaltbare Bluteisen zeigt auf der Höhe der Hämiglobinämie eine Verminderung um 10% des Ausgangswertes.

7. Es wird die Anschauung vertreten, daß ein relativer Mangel der Zelle an reifem Hämoglobin mit einer Sphärozytose der Zelle kausal verknüpft ist. Die ursächliche Bedeutung der Formalgenese der roten Blutzelle für die Heinzkörperbildung wird gestreift.

Literatur.

Abderhalden, E.: Z. physiol. Chem. **25**, 65 (1898). — Bang, O., and Sɔren L. Ørskov: J. clin. Invest. **18**, 497 (1939). — Barkan, G.: Z. physiol. Chem. **148**, 124 (1925). — Barkan, G., u. O. Schales. Z. physiol. Chem. **248**, 96 (1937). — Borst u. Königsdörffer: Untersuchungen über Porphyrie. Leipzig 1929. Zit. bei Heilmeyer. — Bürker, K.: Hdb. der norm. u. path. Physiologie, Bd. VI, Teil 1, S. 45. 1928. — Cash and Dunstan: Phil. Trans. roy. Soc. B. **148**, 505 (1893). Zit. Cushny, Hdb. der exp. Pharm., Bd. I, S. 833. 1923. — Cesaris-Demel: Fol. haemat. (Lpz.) 4, 4 (1907). — Cnyrim, M., u. P. Moser: Unveröffentlicht. — Conant, J. B., and N. D. Scott: J. of biol. Chem. **68**, 107 (1926). — Damashek, W., and St. O. Schwartz: Amer. J. med. Sci. **196**, 769 (1938). — Engel: Wien. Arch. inn. Med. 7, 192 (1924). — Fol. haemat. (Lpz.) **33**, (1926). — Fleckenstein, A., u. H. Hertel: Pflügers Arch. **250**, 577 (1948). — Heilmeyer, L.: Hdb. der inn. Med., Bd. II, S. 31. 1942. — Heubner, W.: Erg. Physiol. **43**, 9 (1940). — Klin. Wschr. **1941**, 137. — Dtsch. med. Wschr. **1943**, 387. — Issekutz, B. v. jr: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **193**, 551, 567, 569 (1939). — Jung, F.: Klin. Wschr. **1942**, 917; **1947**, 459. Zit. Klin. Wschr. **1940**, 1016. — Keller, Ch. J., u. K. A. Seggel: Fol. haemat. (Lpz.) **52**, 241 (1934). — Kiese, M.: Klin. Wschr. **1946**, 81. — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 288 (1947). — Kiese, M., u. Waltraud Schwartzkopff-Jung: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 267 (1947). — Krebs: Zit. bei E. Lehnartz: Einf. i. d. chem. Physiologie, S. 348. Berlin 1942. — Laves: Vortrag 3. Tagg. Dtsch. Hämatolog. Ges. 1949. — Leech: Brit. med. J. **1893 I**, 1305. Zit.: Cushny, Hdb. der exp. Pharm., Bd. I, S. 833. 1923. — Meyer, P. F.: Z. Klin. Med. **117**, 375 (1931). — Moeschlin, S.: Schweiz. med. Wschr. **1940 I**, 786; **1941**, 789. — Morawitz, P.: Arch. f. exper. Path. **60**, 298 (1909). — Moser, P., u. P. Krause: Z. inn. Med. **1948**, 686. — Pulina, B.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **200**, 324 (1942/43). — Rimington, C., u. J. J. Quin: Biochem. Z. **269**, 4 (1934). — Seggel, K. A.: Fol. haemat. (Lpz.) **52**, 250 (1934). — Klin. Wschr. **1937 I**, 382. — Seyfarth: Dtsch. med. Wschr. **1923 I**, 180. — Klin. Wschr. **1927 I**, 487. — Fol. haemat. (Lpz.) **34** (1927). — Wilhelmi, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **200**, 305 (1942/43). — Wyman, Jeffries: Heme Proteins in Advances in Protein Chemistry, Bd. IV, S. 407. New York 1948.

Dr. Peter Moser, (16) Frankfurt a. M., Med. Univ.-Klinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, 49—59 (1950).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Schulemann).

Die Beeinflussung des Bezold-Jarisch-Reflexes durch zentralwirksame Analeptika und Sympathicomimetika.

Von
Hans Friedrich Zipf.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 23. September 1949.)

Bei der Analyse des Bezold-Jarisch-Reflexes (BJR) nach Veratrin, Mistelherzstoff, Akonitin und anderen „Detektorstoffen" hatten Jarisch und seine Mitarbeiter schon verschiedene Möglichkeiten entdeckt, durch die die Reflexwirkungen, Bradykardie (durch Erregung des Herzvaguszentrums) und Blutdrucksenkung (durch Hemmung des Vasomotorenzentrums) ganz oder teilweise aufgehoben werden konnten.

Atropin wirkte beim Mistelkollaps nur auf die Peripherie des kardio-kardialen Reflexweges, beseitigte also die Bradykardie, nicht aber die Blutdrucksenkung, oder vielmehr nur denjenigen kleinen Anteil, der auf die Bradykardie selbst entfiel (Jarisch und Henze[11], Jarisch und Richter[12]). Unterbrechung der afferenten Fasern in den Halsvagi (Eiskühlung oder Durchschneidung) brachte sowohl die kardio-kardial bedingte Bradykardie als auch die kardiovaskulär ausgelöste Blutdrucksenkung zum Verschwinden (Jarisch und Henze[11], Jarisch und Richter[12], Jarisch[9]). In gleicher Richtung wirkte die intravenöse Verabreichung von Ca^{++}-ionen (Amann und Jarisch[1], Job[13]). Nach Eichholtz, Fleckenstein und Muschawek[3] waren Ca^{++}-ionen, Lokalanästhetika und ihnen verwandte Antihistaminkörper vorausgegeben in der Lage, die Wirkung nachfolgender Veratrininjektionen ganz oder teilweise zu unterdrücken. Das Erfolgsorgan schließlich, die Gefäßmuskulatur reagiert im Sinne einer kräftigen Blutdrucksteigerung auf Adrenalin.

Zu den bisher beschriebenen Einflußstellen treten die Zentren selbst, das vagale Herzhemmungszentrum und das Vasomotorenzentrum. So konnte man auch an die Wirksamkeit der zentral angreifenden Analeptika denken. Mit der direkten Fragestellung, in welcher Weise diese Mittel gegenüber dem depressorischen und bradykardischen BJR wirken, wurden bisher keine Untersuchungen durchgeführt. Wohl wird von verschiedenen Autoren für den optimalen Nachweis einer Analeptikumwirkung empfohlen, alle gegenregulatorischen Kreislaufreflexe auszuschalten (Abklemmung der Karotisarterien, beiderseitige Vagusdurchschneidung). Es liegt hier auch ein praktisches Interesse vor, weil der BJR (übrigens auch alle sonstigen depressorischen Reflexmechanismen) als *Modellversuch für einen reflektorischen Kollaps* gelten kann. Dieser bildet wiederum einen Sonderfall in der Einteilung der verschiedenen klinischen Kollapsformen.

Das Ziel unserer Versuche war also, am BJR zu prüfen, ob und inwieweit die von den Herzrezeptoren reflektorisch gesetzte Erregung des Herzhemmungszentrums und Vasomotorenzentrums durch zentralwirksame Analeptika beeinflußt werden kann, um damit eine weitere pharmakologische Basis für deren klinische Brauchbarkeit in der Behandlung des (reflektorischen) Kreislaufkollapses zu gewinnen. Untersucht wurden Kohlensäure, Cardiazol, Coramin und Strychnin. Wegen seiner zentralen Komponente wurde Pervitin, und im Vergleich zu dessen sympathikomimetischer Komponente auch Adrenalin und Sympatol miteinbezogen.

Methodik.

Die Versuche erfolgten meist an Katzen, zum Teil auch am Kaninchen und am Hund. Narkose: bei der Katze 180—200 mg/kg Avertin peroral, nach Bedarf nachträglich 30—40 mg/kg Numal „Roche" intraperitoneal oder intravenös; beim Kaninchen 1 g/kg Urethan (25%) intravenös; beim Hund 70 mg/kg Chloralose intravenös und 30 mg/kg Numal „Roche". Da uns nur noch eine geringe Menge Viscotoxin zur Verfügung stand, stellten wir den BJR hauptsächlich mit Veratrinsulfat ein. Dosierung: (50) - **100** - **200** - (400)/kg Veratrinsulfat intravenös. Es erwies sich als vorteilhaft, nach dem Vorgehen von HENZE[8] vor der Injektion des Detektorstoffes die beiderseitigen Halsnerven reizlos durch Unterkühlung mit Eis zu blockieren. Der BJR erfolgte dann erst nach Wiedererwärmung der Vagusnerven, trat aber eindrucksvoller auf und hielt länger an. Blutdruckschreibung mit dem Hg-manometer in allen Fällen aus der rechten A. carotis. Die Abklemmung der linken Karotisarterie bedeutete somit völlige Ausschaltung beider Karotissinusfelder. Die untersuchten Stoffe wurden durch eine Jugularisvene eingespritzt. Wegen der Eigenwirkung des Veratrins auf die Atmung erfolgte in den meisten Fällen künstliche Atmung durch eine Starlingpumpe. Über letztere wurde auch das zu prüfende CO_2-Luftgemisch dem Tiere zugeleitet. Im Hinblick auf die Stärke und Dauer des eingetretenen BJR erwiesen sich 30 Versuchstiere (26 Katzen, 3 Kaninchen und 1 Hund) einwandfrei für die Beurteilung der zu prüfenden Stoffe geeignet.

Versuchsergebnisse.

1. Wirkung der Kohlensäure.

In Analogie zu den Ergebnissen von BAYLISS[2] sowie v. D. VELDEN[19], wonach die Depressorreizung auf der Höhe der asphyktischen Blutdrucksteigerung unwirksam bleibt, zeigten JARISCH und HENZE[11] und später ZIPF[21] für den Mistelherzstoff, daß die *reine Erstickung* den depressorischen BJR zu durchbrechen vermag. Nach ZIPF war eine starke CO_2-stauung bei narkotisch bedingter periodischer Atemlähmung in der Lage, den BJR nach Viscotoxin zu verhindern. Dieser trat erst nach Einleitung künstlicher Atmung auf.

Wir verwendeten *Gemische* von CO_2 mit Luft, in einer Konzentration von 5 und 10%. In der Abb. 1 ist die Wirkung eines 10% CO_2-Luftgemisches auf den Veratrinkollaps eines Kaninchens mit ausgeschalteten Karotissinusnerven dargestellt. Nach dem Anstieg des Blutdruckes und der Pulsfrequenz infolge Eiskühlung der Vagusnerven blieben 100 γ/kg Veratrinsulfat intravenös zunächst ohne Einfluß. Erst nach Wiederherstellung der Leitungsfähigkeit durch Erwärmen traten Blutdrucksenkung und Bradykardie schnell ein. CO_2-Einatmung bewirkte Blutdruckanstieg, [illegible] bis zur Höhe vor der

CATALOGUED MAR 8 1951
BOSTON MAR 7 1951 MEDICAL LIBRARY

Vaguskühlung. Die Pulsfrequenz blieb zunächst gleich. Erst am Ende der CO_2-Einatmung trat eine gewisse Pulsbeschleunigung, aber keine Normalisierung in Erscheinung. Während des Veratrinkollapses beobachteten wir an 5 Tieren (3 Katzen, 2 Kaninchen) mit ausgeschalteten Karotissinusrezeptoren nach CO_2 Blutdruckanstiege bis zur Norm. Der Puls zeigte sich nur in 2 Fällen unbeeinflußt, bei den übrigen Tieren kam es anfänglich zu einer Verstärkung der Bradykardie und dadurch zu einer weiteren, aber nicht erheblichen Blutdrucksenkung, der sich dann die Steigerung anschloß. Die Befunde glichen völlig den Erscheinungen nach Einatmung von reiner CO_2 bzw. bei reiner Erstickung, sowohl im Veratrin- als auch im Viscotoxinkollaps. Die zentrale Reizung des Vagus-

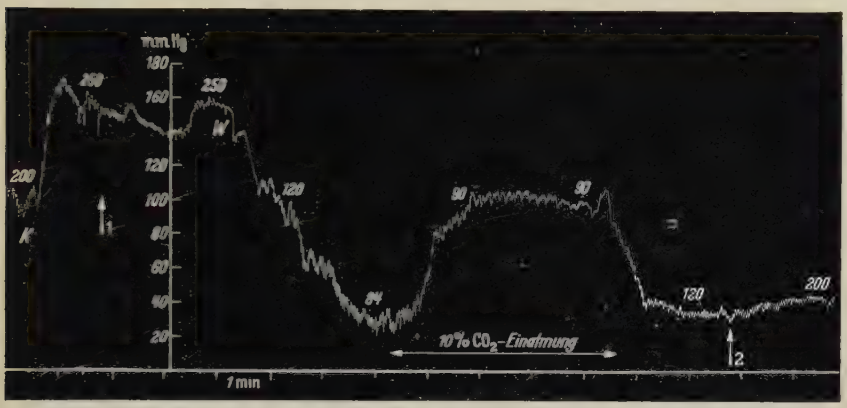


Abb. 1. Kaninchen, ♂, 2,4 kg. Narkose: 1 g/kg Urethan intravenös. Künstliche Atmung. Blutdruck: Hg-manometer in rechter A. carotis. Linke A. carotis abgeklemmt. Bei K wurden beide Vagusnerven eisgekühlt, bei W wieder erwärmt. 1: 100 γ/kg Veratrinsulfat i. v. Von < bis > Einatmung eines 10% CO_2-Luftgemisches. 2: 10 mg/kg Coramin intravenös.

zentrums durch CO_2 verstärkte vom Herzhemmungszentrum her die über den kardiokardialen Zweig des BJR bedingte Bradykardie. Sie ist allerdings (nach Gollwitzer-Meyer, zit. nach Rühl[16]) nicht obligatorisch. Ihr Ausmaß bewirkte in einigen, aber nicht in allen Fällen das Eintreten einer erneuten Blutdrucksenkung. Diese wurde im weiteren Verlaufe wieder kompensiert und übertroffen durch den Erfolg der Reizung des Vasomotorenzentrums. Die tonisch-reflektorische Hemmung dieses Zentrums von den Herzrezeptoren her (kardiovaskulärer Zweig des BJR) wurde damit erfolgreich durchbrochen. Die Verstärkung der Bradykardie im Anfangsteil der CO_2-Einatmung stellt einen unerwünschten Begleiter ihrer sonst günstigen Wirkung im reflektorischen Kollaps dar. Nach neueren Versuchen von Göpfert[5] am gekreuzten Kreislauf von Hunden (isolierter Kopf) bei Erstickung und O_2-Mangel kann man auch für unsere CO_2-Versuche (bei genügendem O_2-Angebot) eine Wirkung auf die Herzrezeptoren selbst ausschließen.

2. Die Wirkung von Cardiazol, Coramin und Strychnin.

Cardiazol hatte bei ausgeschalteten Karotissinusnerven in der Dosierung von 5—50 mg/kg intravenös sowohl im Veratrin- als auch Viskotoxinkollaps bei Katzen recht unsichere Wirkungen. Nur selten ließ sich eine dauernde Aufhebung des BJR nachweisen. In solchen Fällen hatten wir den Eindruck, daß die Spontanerholung als mitwirkender Faktor hinzu kam. Die Abb. 2 bringt als Beispiel schon eine recht optimale Blutdrucksteigerung während eines Veratrin-BJR. In den meisten Fällen war sie von geringerer Stärke und kürzerer Dauer. Nach Zweit- oder Drittinjektionen ergab sich (auch bei Dosensteigerung) eine erheb-

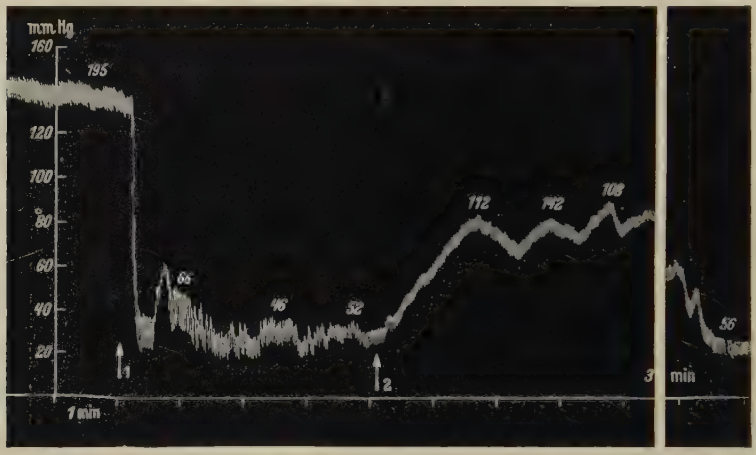


Abb. 2. Katze, ♀, 2 kg. Narkose: 180 mg/kg Avertin peroral und 35 mg/kg Numal intraperitoneal. Künstliche Atmung. Blutdruck: Hg-manometer in rechter A. carotis. Linke A. carotis abgeklemmt. 1 : 400 γ/kg Veratrinsulfat, 2 : 20 mg/kg Cardiazol intravenös.

lich schwächere Wirkung, oder es fehlte diese völlig (Abb. 5). Die Pulsfrequenz zeigte die gleiche geringe Beeinflussung wie der Blutdruck. Auffallend war die Erhöhung der Krampfschwelle im depressorischen Reflex (durch Veratrin und Viskotoxin), auch wenn man den Einfluß der Avertin- bzw. Numalnarkose berücksichtigt. Als Erstinjektion wirkten 10 mg/kg (6 Fälle), 20 mg/kg und 50 mg/kg (je 1 Fall) nicht krampfauslösend (siehe Abb. 2 und 3). Bei Zweit- und Drittgaben (6 Fälle) von Dosen zwischen 10—40 mg/kg (vor Ablauf der Wirkung der Erstinjektion) kam es nur einmal (20 mg/kg) zu sehr schwachen Krämpfen. Im Versuch der Abb. 3 wurde die sehr hohe Dosis von 50 mg/kg Cardiazol intravenös während eines BJR durch Viskotoxin krampflos ertragen. Die Beschleunigung der Spontanatmung hielt deutlich länger an als der flüchtige pressorische und pulsbeschleunigende Effekt. Angesichts so hoher Dosen kann wohl als sicher angenommen werden, daß der BJR durch Irradiation in ähnlicher Weise in das animale Nervensystem

hemmend eingreift, wie dies durch Druck auf den Sinusrezeptoren möglich ist (Koch[14]). Wenn Palme[15] die Erregung bei Cardiazol-Dauerinfusion (solange keine Krämpfe auftraten) durch den Sinusdruckversuch stets unterbrechen konnte, so entspricht dieser Tatsache das Ergebnis unseres Versuches in Abb. 4. Hier führte eine Cardiazolgabe von 10 mg/kg intravenös bei intaktem linkem Karotissinus zu Atembeschleunigung, Blutdrucksteigerung und stärkerer motorischer Erregung

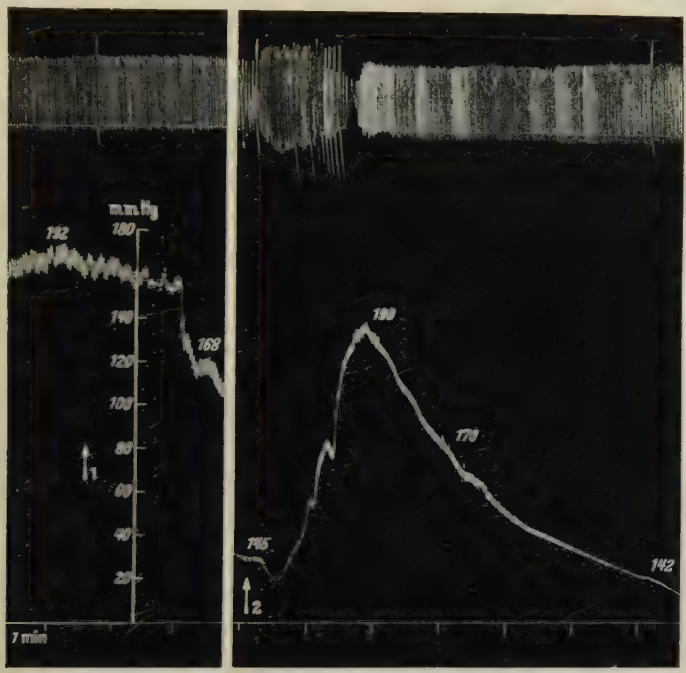


Abb. 3. Katze, ♂, 1,8 kg. Narkose: 200 mg/kg Avertin peroral und 40 mg/kg Numal intraperitoneal. Spontanatmung. Blutdruck: Hg-manometer in rechter A. carotis. Vor 1: 400 γ/kg Viskotoxin in Einzelgaben aufgeteilt intravenös. 1: 100 γ/kg Viskotoxin, 2: 50 mg/kg Cardiazol intravenös.

des Tieres. Die Injektion von 50 γ/kg Veratrinsulfat intravenös stoppte alle Erregungserscheinungen. Das Tier verhielt sich sofort ruhig. Die vorausgehende Cardiazolwirkung konnte das Eintreten des BJR nicht aufhalten, obwohl sie die übrige Zeit noch vorhanden war (siehe rechter Teil der Atemkurve). Vielleicht ist die schnelle Erholungstendenz teilweise auf das Konto der Cardiazolwirkung zu buchen.

Coramin verhielt sich im BJR durch Veratrin noch ungünstiger als Cardiazol. 3 Erstinjektionen (2 Katzen, 1 Kaninchen) von je 10 mg/kg intravenös führten nur bei einer Katze zu einer geringfügigen Blutdrucksteigerung (15 mm Hg) und Pulsbeschleunigung. Einen geringen Erfolg hatte bei einem Kaninchen die Erstgabe von 5 mg/kg. Eine

Zweitgabe von 5 mg/kg war wirkungslos. Ein Beispiel für den alleinigen Einfluß auf den kardio-kardialen Teil des BJR zeigt die Abb. 1 (rechte Hälfte). Die Zweitgabe von 20 mg/kg verstärkte bei einer Katze die bestehende Blutdrucksenkung.

Strychnin wurde wegen der neuerlich wieder angegebenen, tierexperimentell fehlenden Wirkung (ZETTEL[20]) nur an 3 Tieren im Veratrinkollaps geprüft. An einem Hund mit ausgeschaltetem Karotissinus hatten sowohl 50 γ/kg als Erstgabe, als auch 100 γ/kg Strychninnitrat (als

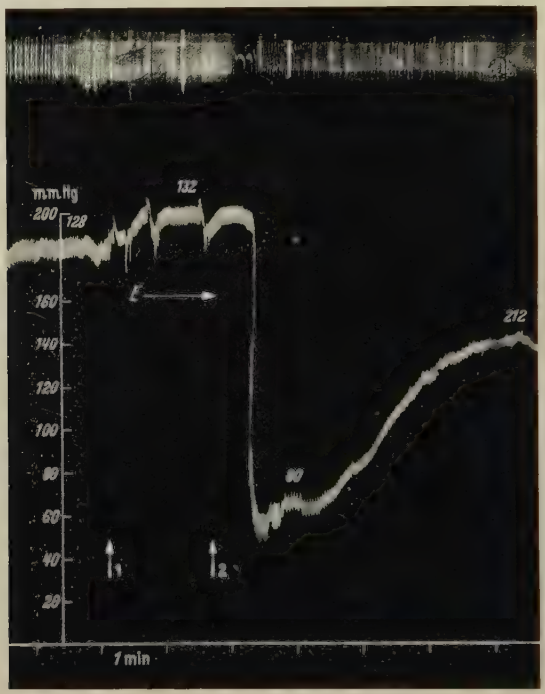


Abb. 4. Katze, ♀, 2,5 kg. Narkose: 200 mg/kg Avertin peroral und 30 mg/kg Numal intraperitoneal. Spontanatmung. Blutdruck: Hg-manometer in rechter A. carotis. 1 : 10 mg/kg Cardiazol intravenös. E: starke Unruhe des Tieres, 2 : 50 γ/kg Veratrinsulfat intravenös.

weitere Dosis) praktisch keine Wirkung auf Hypotonie und Bradykardie. Bei einem Kaninchen steigerte 100 γ/kg, erstmalig gegeben, den Blutdruck nur wenig, die Pulsfrequenz dagegen stärker. Eine weitere Gabe von 100 γ/kg führte unter Ausbruch von kurz dauernden tetanischen Krämpfen zu einer ebenso kurz dauernden steilen Blutdrucksteigerung.

Diese krampfbedingten, steilen BD-zacken waren auch bei hochgesteigerten Cardiazol- und Coramininjektionen nachzuweisen. Ähnlich wie die Erstickung durchbricht die Krampferregung jede reflektorische Hemmung des Vasomotorenzentrums (siehe PALME[15]). Die durch die Krämpfe bedingte Rückflußförderung des Blutes zum Herzen (GOLLWITZER-MEYER[6]) bildet jedoch die wichtigste Komponente.

3. Die Wirkung von Pervitin, Adrenalin und Sympatol.

Pervitin wurde zunächst wegen seiner zentralen Wirkungskomponente in die Untersuchung der Beeinflußbarkeit des BJR einbezogen. Die überwiegende periphere Gefäßkomponente verdeckte aber in unserer Versuchanordnung den Nachweis einer eventuellen pressorischen Wirkung auf das Vasomotorenzentrum. Intravenöse Gaben von ½ mg und 1 mg/kg führten bei 7 Tieren (6 Katzen, 1 Hund) im Veratrinkollaps zu rasch eintretenden, lange andauernden Blutdrucksteigerungen bis zur Norm oder über diese hinaus (Abb. 5 und 6). Die Pulsnormalisierung wurde nur selten schnell erreicht. Bei 3 Tieren (Katzen) mit ausgeschaltetem Karotissinus verstärkte sich die Bradykardie sogar vorübergehend, wie überhaupt auf der Höhe der Blutdrucksteigerung Rückfälle in typisch vagale Pulsfolgen vorkamen. Die Blutdrucksteigerung setzte, wenn auch

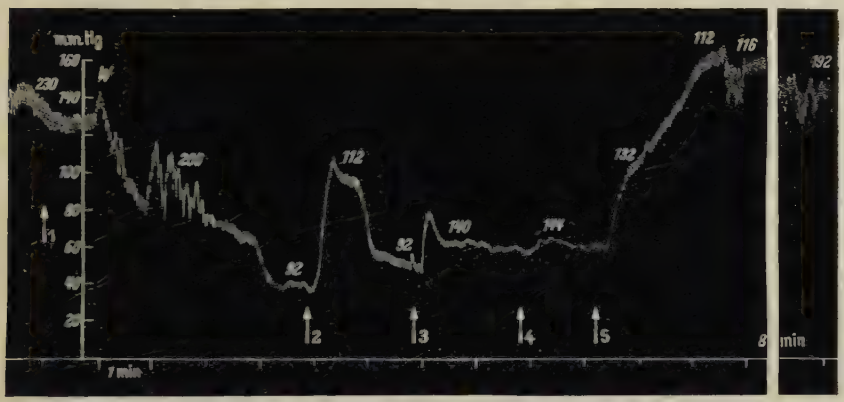


Abb. 5. Katze, ♀, 2,5 kg. Narkose: 200 mg/kg Avertin peroral und 30 mg/kg Numal intraperitoneal. Blutdruck: Hg-manometer in rechter A. carotis. Künstliche Atmung. Bei K wurden beide Vagusnerven eisgekühlt, bei W wieder erwärmt. 1 : 200 γ/kg Veratrinsulfat, 2 : 10 γ/kg Adrenalin, 3 und 4: je 10 mg/kg Cardiazol, 5 : 0,5 mg/kg Pervitin intravenös.

nicht ganz so steil, so doch adrenalinähnlich ein. Die von Adrenalin bekannten verhängnisvollen Kreislauf- und Herzreflexe werden bekanntlich bei intakten oder angespanntem Kreislauf auch dem Pervitin zugeschrieben. In unserem Falle haben wir das Beispiel eines typisch vagal gespannten Kreislaufzustandes vor uns. Die chemisch sensibilisierten Herzmuskelrezeptoren sprechen wahrscheinlich auf schnelle, robuste Druckerhöhungen noch empfindlicher an als die daneben noch eingeschalteten Rezeptoren. Der dadurch verstärkte kardio-kardiale Wirkungszweig des BJR verzögert die Pulsnormalisierung, ja er führt teilweise zu einer erneuten Bradykardie. In die gleiche Richtung geht die Beobachtung, daß während des durch Nagusunterkühlung erzielbaren Blutdruckanstieges gelegentlich schnell eintretende und vorübergehende Rückfälle in erneute Senkung und Pulsverlangsamung vorkommen. Wir deuten diesen Befund

nicht als Wiederleitendwerden bereits blockierter afferenter Bahnen, denn dies beansprucht bei Abstellung der Kühlung erfahrungsgemäß eine längere Zeit, sondern als eine verstärkte Erregung der sensibilisierten Herzrezeptoren durch den brüsken Druckanstieg und deren afferente Leitung über noch nicht blockierte afferente Fasern.

Adrenalin wurde im BJR schon von JARISCH untersucht. In unseren Vergleichsversuchen gegenüber Pervitin ergaben sich für die Dosen von 5—20 γ/kg Adrenalin intravenös in 8 Fällen Drucksteigerungen und Pulsbeschleunigungen, natürlich schnell vorübergehend (Abb. 5 und 6).

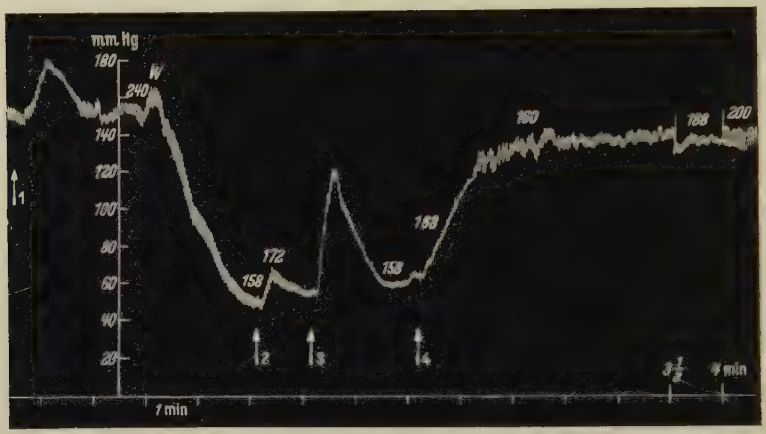


Abb. 6. Katze, ♀, 2,3 kg. Narkose: 200 mg/kg Avertin peroral u. 30 mg/kg Numal intraperitoneal. Künstl. Atmung. Blutdruck: Hg-manometer in rechter A. carotis. Beide Vagusnerven eisgekühlt, bei W wieder erwärmt. 1 : 200 γ/kg Veratrinsulfat, 2 : 5 γ/kg, 3 : γ 10/kg Adrenalin, 4 : 1 mg/kg Pervitin intravenös.

Wie bei Pervitin beobachteten wir teilweise, vagale, bradykardische Pulsserien auf der Höhe der Blutdrucksteigerung.

Sympatol hatte in einer Dosierung von 1 mg/kg intravenös bei 3 Tieren (2 Katzen, 1 Kaninchen) nur Blutdrucksteigerungen und Pulsbeschleunigung zur Folge. Die Wirkungsdauer betrug mehrere Minuten. Steigerung des Herzreflexes konnten wir nicht beobachten.

Besprechung.

Neben den bisher bekannten Formen des Kollapses durch Entblutung, periphere Gefäß-, seltener auch reine Herzschädigung, sowie zentrale toxische Lähmung des Vasomotorenzentrums hat in den letzten 10 Jahren der reflektorische Kollaps an Beachtung gewonnen. Die Liste der durch nozizeptive Erregung peripherer Rezeptorenfelder auslösbaren Zustände ist wohl größer, als aus der Aufzählung folgender Möglichkeiten hervorgeht: Myokardinfekt (BJR), Lungenembolie (Lungenentlastungsreflex nach SCHWIEGK), Karotissinusreizung (-Synkope), GOLTZscher Klopfversuch, Hodenquetschung, CRÉDÉscher Handgriff, Vestibularisreizung (Seekrankheit), Erregung oder Ätzung der Magen- und Darmschleimhaut.

Alle diese auslösenden Faktoren führen durch die reflektorische Erregung des vagalen Herzhemmungszentrums und die aktive Hemmung des Vasomotorenzentrums zu typischen Kollapsbildern des Kreislaufes, bei denen wir entweder die vagal ausgelöste Bradykardie und die Hypertonie gemeinsam antreffen oder wenigstens einer dieser Wirkungszweige zustande kommt. Durch die Ausstrahlung in das übrige vegetative System und in das animale Nervensystem (Schlafneigung, Stoffwechselniedrigung, Sinken des Muskeltonus und der Rückenmarkserregbarkeit) ergreifen sie schließlich den gesamten Organismus im Sinne einer protektiven Reaktion parasympathischer Färbung (Jarisch[10]), als Gegenstück zur Notfallsfunktion nach Cannon.

Der Anlaß zum Eingreifen ist für den Therapeuten dann gegeben, wenn es zu einem Überschießen des parasympathischen Schutzsyndroms in das lebensbedrohende Stadium des Kollapses kommt. Bei der verbreiteten Anwendung zentraler Analeptika wie Cardiazol, Coramin u. a. im Kreislaufkollaps muß berücksichtigt werden, daß ein reflektorisch ausgelöster, depressorischer Kreislaufzustand ganz andere Bedingungen bietet als etwa eine narkotisch herbeigeführte Lähmung der medullären Zentren. Die Wirkung der Analeptika ist in praxi nicht immer sicher, so daß sich die Frage erhebt, ob sich gerade im reflektorischen Kollaps ungünstigere Wirkungsbedingungen darbieten.

Im Tierversuch fiel der Analeptikumtest völlig wechselnd aus, so daß erst einmal von Palme[15], sowie Hahn[7] die optimalen Wirkungsbedingungen gekennzeichnet wurden. Sie bestanden in Ausschaltung der depressorischen Kreislaufreflexe durch Abklemmung der Karotisarterien und durch beiderseitige Vagusdurchschneidung, während v. Elsveld[4] durch Dezerebrierung früher schon den Einfluß des Narkotikums beseitigt hatte. Die Analeptikumwirkung trat nun deutlich hervor.

Über den Einfluß normal arbeitender Reflexmechanismen hinaus, diese absichtlich in einen pathologischen Erregungszustand zu versetzen und die Wirkung der Analeptika im Hinblick auf den klinischen reflektorischen Kollaps im pharmakologischen Modellversuch zu prüfen, war die Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen. Nicht nur der Karotissinus-Druckversuch kann hierbei als geeignete Versuchsanordnung gelten (Palme[15]), sondern auch der von uns gewählte Bezold-Jarisch-Effekt nach Veratrin oder Viskotoxin.

Die dabei unvermeidliche narkotische Beeinflussung des Zentralnervensystems muß als wichtiger Unterschied gegenüber den Verhältnissen am nicht narkotisierten Patienten (es sei denn während einer chirurgischen Narkose) kritisch in Betracht gezogen werden.

In dieser Weise geprüft, hatte *Cardiazol* bis zur Krampfschwelle hin im reflektorischen Kollaps nach Veratrin und Viskotoxin eine recht geringe Wirkung. Sofern es zu einer völligen oder teilweisen Restitution des Blutdrucks und der Pulsfrequenz kam, war die Wirkung nur von kurzer Dauer, obwohl sie latent (Atembeschleunigung) noch andauerte. Vorausgeben von Cardiazol konnten den Veratrinkollaps nicht verhindern. *Coramin* war am Blutdruck in der Dosierung von 5—20 mg/kg

i. v. praktisch wirkungslos. Es beseitigte höchstens die Bradykardie, so daß die sehr geringen Blutsteigerungen dieser Wirkung zugeschrieben werden können. Höhere Dosen verstärkte sogar die BD-Senkung. *Strychnin* war völlig wirkungslos. Krampfdosen aller 3 Mittel ergaben nur unspezifische, steile, kurze Steigerungen, die keinen Wert für eine klinisch praktische Brauchbarkeit der Mittel besitzen. Abgesehen von der Wirkung des Narkotikums hatte der depressorische Reflex nach Veratrin und Viskotoxin infolge Irradiation ins animalische Nervensystem hinein einen deutlich erhöhenden Einfluß auf die Krampfschwelle von Cardiazol. Diese Beobachtung, die den Erfahrungen von Palme[15] nach Sinusdruckreizung entspricht, ist von einer gewissen Bedeutung für die Klinik, weil man sich dort immer gescheut hat, durch zentralwirksame Analeptika etwa einen Kranken mit Myokardinfarkt zentral zu erregen. Sofern sich dieser gerade in der Phase eines parasympathischen Schutzsyndroms befindet, sind diese Mittel in ihrer Wirkung ohnehin gehemmt.

Schaefer[17] gibt an, daß während eines Falles von „Hyperreflexie des Herzens" (mit typischen Bezold-Jarisch-Reflexen) bei einem seiner Mitarbeiter Cardiazol völlig wirkungslos war. Diese Erfahrung dürfte nicht vereinzelt dastehen.

Am wirkungsvollsten von allen zentral angreifenden Analeptika verhielt sich im Veratrinkollaps die *Kohlensäure*. In einer Konzentration von 5 und 10% steigerte sie mehr oder weniger schnell, aber regelmäßig den Blutdruck zur Norm. Die teilweise auftretende Verstärkung der Bradykardie und Zunahme der Blutdrucksenkung muß als ungünstige Anfangsphase der sonst positiven Wirkung aufgefaßt werden. Sie ergibt sich aus der zentralen Erregung des Herzvaguszentrums und wird schließlich durch die pressorische Vasomotorenerregung kompensiert und übertroffen.

Angesichts der praktischen Wirkungslosigkeit von Cardiazol, Coramin und Strychnin dürfte auch die zentrale Wirkungskomponente des *Pervitins* ohne Einfluß sein. Seine länger dauernde pressorische Wirkung im Veratrinkollaps ist peripher bedingt, in ganz ähnlicher Weise wie bei *Adrenalin* und *Sympatol*. Im Gegensatz zu Sympatol verstärkte der rasche Blutdruckanstieg durch Adrenalin und Pervitin in einigen Fällen die kardio-kardiale Zweigwirkung des BJR. (Zunahme der Bradykardie, vagale Pulsserien.) Die Normalisierung des Pulses setzte sich erst nach einiger Zeit völlig durch. Cerletti, Freudiger und Rothlin (zit. nach Jarisch[10b]) vermochten das Katzenherz mit Veratrin so zu sensibilisieren, daß die blutdrucksteigernde und pulsbeschleunigende Wirkung des Adrenalins sich ins Gegenteil verkehrte.

Schimert[18] suchte am tierexperimentell erzeugten künstlichen Infarkt (durch Koronarverschluß) den Einfluß von Sympatol zu klären. Minutenvolumen und Herzarbeit stiegen erheblich, synchron hiermit die Koronardurchblutung. Der Blutdruck änderte sich kaum. Die reflektor. Kleinerstellung des Kreislaufes wurde aufgehoben.

Der praktisch bedeutungslose Einfluß der zentralwirksamen Analeptika, wie auch die nicht ganz harmlose Wirkung der peripheren Gefäß-

mittel im Tierversuch erfordern eine genaue klinische Kontrolle dieser Mittel, möglichst unter Einbeziehung noch weiterer Kreislaufgrößen.

Zusammenfassung.

Im Hinblick auf die therapeutischen Möglichkeiten beim reflektorischen Kreislaufkollaps wurde im Modellversuch (Bezold-Jarisch-Reflex nach Veratrinsulfat oder Viskotoxin) an Versuchstieren (Katze, Kaninchen, Hund) der Einfluß verschiedener zentral wirksamer Analeptika und Sympathikomimetika untersucht.

Cardiazol (5—50 mg/kg intravenös) konnte nur für kurze Zeit den Bezold-Jarisch-Reflex total oder partiell durchbrechen. Coramin war in der Dosierung von 5—20 mg/kg intravenös, ebenso wie Strychnin (50—100 mg/kg intravenös) völlig wirkungslos. Die Krampfschwelle von Cardiazol war durch Ausstrahlung des Reflexes ins animalische Nervensystem hinein deutlich erhöht.

Kohlensäure (5 und 10%ige Gemische mit Luft) zeigte die beste Wirkung. Der zuverlässig eintretenden Blutdruck- und Pulserhöhung ging teilweise ein bradykardisches Anfangsstadium voraus, in dem sich die Hypotonie vorübergehend verstärken konnte.

Adrenalin (5—20 γ/kg intravenös), Sympatol (1 mg/kg intravenös) wirkten vorübergehend, Pervitin ($\frac{1}{2}$—1 mg/kg intravenös) für längere Zeit steigernd auf den Blutdruck und die Pulsfrequenz. Im Gegensatz zu Sympatol lösten die beiden anderen Mittel durch den raschen Blutdruckanstieg (wahrscheinlich über den kardio-kardialen Wirkungszweig des BJR) eine Zunahme der bestehenden Bradykardie und das Auftreten typischer vagaler Pulsfolgen aus.

Literatur.

[1] Amann, A., u. A. Jarisch: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **201**, 46 (1943). — [2] Bayliss, W. M.: J. of Physiol. **14**, 303 (1893). — [3] Eichholtz, Fr., A. Fleckenstein, u. R. Muschawek: Klin. Wschr. **1949**, 71. — [4] Esveld, L. W. van: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **149**, 348 (1930). — [5] Göpfert, H.: Pflügers Arch. **249**, 209 (1947). — [6] Gollwitzer-Meyer, Kl.: Klin. Wschr. **1936**, 508. — [7] Hahn, Fr.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **198**, 472 (1941). — [8] Henze, C.: Arch. internat. Pharmacodynamie **53**, 44 (1936). — [9] Jarisch, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **197**, 266 (1941). — [10] Jarisch, A.: a) Klin. Med. **3**, 956 (1948); b) Wien, klin. Wschr. **1949**, 1. — [11] Jarisch, A., u. C. Henze: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **187**, 706 (1937). — [12] Jarisch, A., u. H. Richter: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **195**, 89 (1940). — [13] Job, C.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **202**, 633 (1943). — [14] Koch, E.: Z. Kreislaufforschg **24**, 251 (1932). — [15] Palme, Fr.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **183**, 170 (1936). — [16] Rühl, A.: Verh. dtsch. Ges. Kreislaufforschg **1938**, 134. — [17] Schaefer, H.: Klin. Wschr. **1943**, 553. — [18] Schimert, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 473 (1947). — [19] Velden, R. v. d.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **55**, 223 (1906). — [20] Zettel, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 283 (1949). — [21] Zipf, H. F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 209, 165 (1950).

Prof. Dr. H. F. Zipf, Bonn, Pharmakol. Institut.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 60—70 (1950).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. h. c. Franz Volhard).

Zur Wirkung von Nitrit auf rote Blutzellen des Menschen.

Von
Peter Moser.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 13. Juli 1949.)

Die Wirkung eines Oxydationsmittels auf rote Blutzellen ist abhängig von der speziellen Form der Zelle. Von Heubner und Mitarbeitern ist die Wirkung von Hämiglobinbildnern auf rote Blutzellen bei verschiedenen Tieren beschrieben worden. Die Art der Veränderung ist abhängig von der Komposition des wirkenden Mittels und von den Besonderheiten der Zelle und ihres Stoffwechsels, der bei Fleisch- und Pflanzenfressern Unterschiede zeigt. Während an der Spezifität der Form und Funktion roter Blutzellen der Ordnungen der Plazentalia kein Zweifel ist, hat die Frage, inwieweit jüngere und ältere Zellen innerhalb der Zellpopulation einer Gattung sich nach Form und Funktion unterscheiden lassen, starkes Interesse. Sie ist gleichbedeutend mit der Frage nach dem Feinbau der roten Blutzelle und hängt mit der Reifung des Hämoglobins und dem Zustand des Innengerüstes zusammen. Der Schlüssel zum Verständnis eines Formwandels der kernlosen roten Blutzelle scheint nach unseren Ergebnissen die Verteilung des Hämoglobins zum Nichthämoglobineiweiß in der Einzelzelle zu sein. Da die Betrachtung der speziellen Zellmorphologie für die Beurteilung der Wirkung eines Hämiglobinbildners von Bedeutung ist, so sei eine Vorbemerkung über die vergleichende Morphologie gestattet.

Bekannt ist die Identität der Protohäme der Mammalia. Abgesehen von Differenzen in der Löslichkeit, im Hydratationsgrad, der Aminosäurekomposition (vgl. Wyman jr.) ist das Molekulargewicht des Hb der Säugetiere eine relativ einheitliche Größe. Ebenso konstant ist der Hb-Gehalt bezogen auf eine Einheit Zellgewicht, dagegen ist das Nichthämoglobineiweiß größeren Schwankungen unterworfen (Abderhalden). Bei Tierarten mit hohem Wert für Nichthämoglobineiweiß findet man gewöhnlich eine große Zellzahl, so daß sich die erhöhten Werte für das Nichthämoglobineiweiß zwanglos erklären, wenn man annimmt, daß dieses zum größten Teil zum Aufbau der Erythrozytenoberfläche verbraucht wird. Bei gleichem Hb-Gehalt pro Einheit Zellgewicht folgt aber für die Einzelzelle daraus ein verschiedenes Verhältnis der Hb-Moleküle zum Nichthämoglobineiweiß. Wenn man eine feste stöchiometrische Bindung des Hb in der Zelle annimmt, so folgt aus diesem Verteilungsverhältnis eine Beziehung zur speziellen Zellform. In Tab. 1 sind einige Werte gegenübergestellt. Während die Konstanz des Quotienten Hb/Volumen innerhalb

Tabelle 1. *Beziehung zwischen Hb-Gehalt, Hb-Konzentration, Zellzahl und Nicht-Hb-Eiweiß* (unter Verwendung der von ABDERHALDEN, PONDER, GOETZE und GULLIVER ermittelten Werte). — Dm = Durchmesser, Di = Dicke; $\gamma\gamma = 10^{-12}$ g.

	Ery-zahl 10^6	Ery Dm μ	Ery Di μ	Hb/ Zelle $\gamma\gamma$	Hb-Konz. %	Sphär. Ind.	Nicht-Hb-Eiweiß in % Zellgewicht
Mensch	5,0	7,4	2,0	30	32	0,28	$<0,8$
Kaninchen . . .	5,93	6,6	1,2	19	30	0,18	1,22
Hund	6,65	6,8	1,8	20	34	0,26	0,99
Katze	7,30	5,7	1,5	12	33	0,27	2,67
Rind	6,03	6,0	1,8	16	32	0,30	6,42
Schaf	13,40	5,2	1,6	11	31	0,31	7,84
Ziege	14,0	6,6	—	6	32	—	5,40

geringer Schwankungen beträchtlich ist, schwanken die Quotienten Hb/Oberfläche nach PONDER und GÖTZE mit einer Variation von $\pm$ 40% und $\pm$ 15%. Vergleicht man die Gewichtsmenge Hb einer Zelle mit dem Quotienten Hb/Oberfläche, so ergibt sich, daß Tierarten, welche relativ mehr Hb pro Oberfläche besitzen, gleichzeitig weniger Hb-Moleküle pro Zelle enthalten. Dies ist jedoch nur vorstellbar bei einer im Verhältnis zum Volumen kleinen Oberfläche. Diese Zellen müssen daher in Richtung eines Sphärozyten determiniert sein. Vergleicht man das Verhältnis von Dickendurchmesser zu Kreisdurchmesser (Sphärischer Index HEILMEYERS) mit den Werten für Nicht-Hb-eiweiß und Volumen, so ergibt sich, daß die roten Blutzellen von Schaf, Katze und Ziege Sphärozyten sein müssen. Diese Tatsache allein könnte Unterschiede in der Höhe der Hämiglobinbildung und Heinzkörperbildung in der Einzelzelle bewirken.

Wir haben die Wirkung von Nitrit auf die roten Blutzellen gesunder Menschen besonders mit Rücksicht auf die Veränderungen der Zellen nach Reduktion des Hämiglobins untersucht, über welche im folgenden berichtet werden soll.

Methodik.

Normalen Versuchspersonen wurden 300—800 mg $NaNO_2$ in 10%iger Lösung intraduodenal oder intravenös gegeben und in zeitlichen Abständen Hämoglobin, Hämiglobin, Erythrozytenvolumen, Zellzahl bestimmt. Hämiglobin wurde nach HAVEMANN, JUNG und v. ISSEKUTZ jr. bestimmt. Hämoglobin als Hämiglobin nach der gleichen Methode. Bei beiden Bestimmungen wurden die von HEUBNER und Mitarbeitern angegebenen Kautelen berücksichtigt. Die Gasbindung wurde im manometrischen Apparat nach v. SLYKE bei 23° bestimmt, nachdem das innerhalb der 1. Std nach Entnahme aus der Vene verarbeitete Oxalatblut bei 23° im Tonometer mit dem gewünschten Gasgemisch 10 min ins Gleichgewicht gesetzt worden war. Das „leicht abspaltbare Bluteisen" wurde nach BARKAN und WALKER im Stufo unter Vorschaltung von Filter S 50 als o-Phenantrolinkomplex bestimmt. Karboanhydrase nach BRINKMAN*. Spezifisches Gewicht des Vollblutes und Serums nach LOWRY und HASTINGS. Die osmotische Resistenz wurde nach 2stündigem Aufenthalt des Ansatzes bei 37° bestimmt und in % Hämolyse angegeben. Die Schwellung der Erythrozyten wurde durch photographische Registrierung der Aufhellung einer Erythrozytensuspension bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen im HAVEMANN-Photometer bestimmt. Diese wurde auf einem 120 mm breiten Film-

* Die Karboanhydrase wurde von cand. med. FRITZ MOSER im Physiologischen Institut Heidelberg bestimmt.

streifen fortlaufend registriert. Verdünnungsverhältnis der Suspension 1 : 250, Küvetteninhalt 22 cm³, Schichtdicke 20 mm, Filter RG 5 Temperatur 20°. (Technik in Anlehnung an JACOBS und PARPART, WILBRANDT.) Hämatokrit nach v. ALLEN.

Ergebnisse.

Der Ablauf der Hämiglobinämie innerhalb der ersten 12 Std und die täglichen Kontrollen über eine Zeitdauer von 6 Tagen, wurden an 10 normalen Versuchspersonen verfolgt. Bei intraduodenaler Applikation entwickelt sich bei den Versuchspersonen etwa 10 min nach Einnahme des Mittels eine langsam zunehmende Zyanose, welche durch die Blässe der Haut ein graues Kolorit erhält. Bei intravenöser Applikation tritt innerhalb 3—4 min erst eine Blässe der Haut auf, später eine an den Schleimhäuten und Fingernägeln besonders deutlich sich abzeichnende Zyanose, welche nach etwa 40—60 min ein Maximum erreicht. Es besteht außer einer zeitlichen Differenz im stadium incrementi der Hämiglobinbildung kein Unterschied im Ablauf der Hämiglobinämie bei intraduodenaler und intravenöser Applikation des Mittels. Im Laufe der nächsten Stunden klingt die Braunfärbung des Blutes langsam wieder ab und erreicht nach 8—12 Std Werte, welche etwas über dem Ausgangswert liegen. Nach 24 Std liegen die Werte in drei Viertel der Fälle immer noch an der oberen Grenze der Norm und nach 36 Std wird erst der Ausgangswert erreicht oder unterschritten. Trägt man den im Maximum der Hämiglobinämie erreichten Hämiglobinwert in % des GesamtHb pro kg Körpergewicht gegen die Nitritmenge auf, so erhält man eine lineare Dosiswirkungskurve, wie sie von v. ISSEKUTZ an der Katze in gleicher Form erhalten wurde.

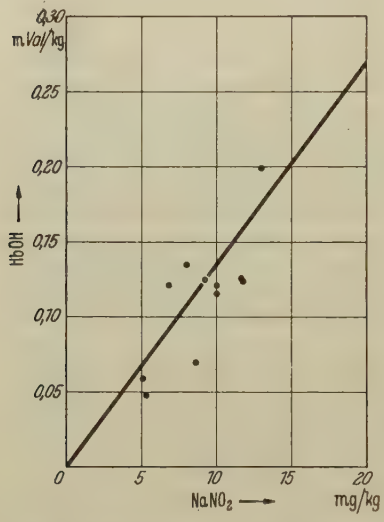


Abb. 1. Dosiswirkungskurve von Natriumnitrit bei normalen Versuchspersonen. Die Umsetzung von Val Hämoglobin : Mol $NaNO_2$ erfolgt im Verhältnis von 09, : 1!

In Abb. 1 wurde statt der Prozentzahl die daraus berechnete Zahl für Millival Hämiglobin aufgetragen, indem einheitlich 75 cm³ Blut auf das kg Körpergewicht angenommen wurde.

Diese Übereinstimmung findet sich nur bei Trägern normaler Erythrozytenpopulationen, wobei der Hb-Gehalt zwischen 14 und 16 g% liegt. 12 Std nach Überschreiten des Maximums der Hämiglobinbildung, bestand jedoch immer noch eine erhebliche klinische Zyanose, welche mit dem gemessenen Hämiglobinwert nicht übereinzustimmen schien.

O_2-*Bindung:* Es zeigte sich, daß zwischen der photometrisch bestimmten Hämiglobinmenge und der Abnahme der Sauerstoffkapazität eine gute Übereinstimmung bestand. Nach Reduktion des Hämiglobins bis fast auf den Ausgangswert liegt bei niederem O_2-Druck der Wert für die zu erwartende O_2-Kapazität niedriger als aus der spektroskopischen Bestimmung zu erwarten war.

Von Darling und Roughton ist der Einfluß des Hämiglobins auf das Gleichgewicht zwischen Sauerstoff und Hämoglobin untersucht worden. Diese Autoren fanden eine Verschiebung der Sauerstoffdissoziationskurve nach links bei Anwesenheit von Hämiglobin. Sie nahmen eine schrittweise Oxydation im Hämoglobinmolekül an. Die höhere Oxydationsstufe des Eisens befähigt die benachbarten zweiwertigen Eisenatome zu einer festeren Bindung (Anlagerung) des Sauerstoffs.

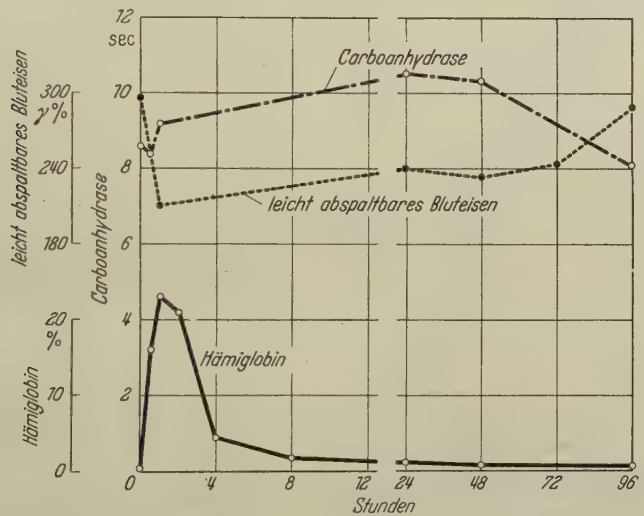


Abb. 2. Beziehung der Hämiglobinämie zum „leicht abspaltbaren Bluteisen" und zur Aktivität des Fermentes Karboanhydrase. 36 J. alter Mann mit 100% Hb, 4900000 Ery. Zu Beginn der Kurve 800 mg $NaNO_2$ intraduodenal. Das L. a. B. zeigt relative Werte an aus einer Verdünnung von 0,2 : 2,0 Blut : Wasser. Die Karboanhydrase-Aktivität ist in Sekunden Reaktionszeit angegeben bei jeweilig gleicher Normalzeit, wobei verlängerte Reaktionszeit der Aktivitätsminderung entspricht.

Die Verschiebung der Dissoziationskurve nach rechts wie in unseren Versuchen, ist durch den Bohreffekt am Hämoglobin zu erklären.

p_H *der Zelle:* Da mit der Oxydation des Hämoglobins zu Hämiglobin die Aktivitätskonstanten der am Globin hängenden Säure- und Aminogruppen sich ändern und die Kohlensäurebindungsfähigkeit der roten Blutzellen herabgesetzt wird, so ist die Abnahme der bei verschiedenen Kohlensäuredrucken gemessenen Kohlensäure bei normalem Blut auf der Höhe der Hämiglobinämie gegenüber dem Ausgangswert nicht verwunderlich. Der Rückgang des Kohlensäurebindungsvermögens der Zelle

wird nach völliger Rückbildung des Hämiglobins jedoch noch stärker. Diese Erscheinung weist auf einen H-Ionen bildenden Prozeß in der Zelle, welcher Ausdruck eines Restitutionsstoffwechsels ist. KIESE stellte fest, daß nach Beendigung der Reduktion des Hämiglobins noch eine starke Milchsäurebildung in *den* Zellen einsetzt, welche Hämiglobin enthielten. Wenn wir diesen aus Stoffwechselversuchen erhobenen Befund KIESES mit dem Kohlensäurebindungsvermögen der Zellen nach Abklingen der Hämiglobinämie in Übereinstimmung bringen, so geht aus unseren Befunden hervor, daß *dieser H-Ionen liefernde Stoffwechselprozeß noch bis zum 3.—4. Tag nach dem Maximum des Hämiglobinämie andauern kann.*

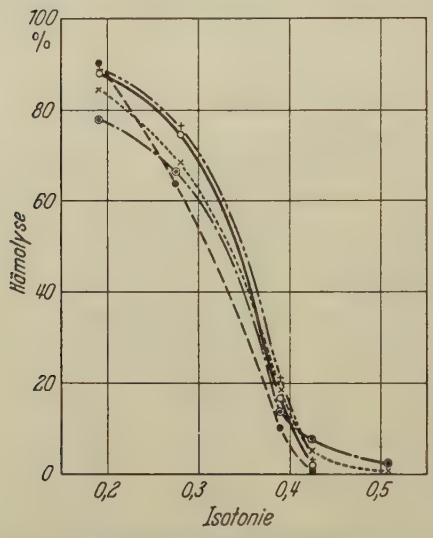


Abb. 3. Osmotische Resistenzkurve bei Nitritbelastung. Ordinate: % Hämolyse. Abszisse: Tyrodelösung ohne Glukose (0,1547 Mol = Isotonie = 1) 35 Jahre alter Mann, 500 mg $NaNO_2$.

×—··—··—× 13. 7. 1948 Vor Nitritgabe. O——O 13. 7. 1948 Maximum der Hämiglobinämie (17% des Ges. Hb ist HbOH). ● — — — ● 14. 7. 1948 HbOH = 1,6%. × ····· × 15. 7. 1948 HbOH = 0,9%. ○—·—⊙ 18. 7. 1948 HbOH = 0,55%.

Karboanhydrase: Diese Änderung des p_H in der Zelle beeinflußt auch die Beschleunigung des Kohlensäureabtausches durch das Ferment Karboanhydrase und die Eisenabspaltung aus Hämoglobin. Die Aktivität der nicht an die Eiweißstruktur der Zelle gebundenen Karboanhydrase wird nach Untersuchungen von KIESE und HASTINGS durch Oxydationsmittelgehemmt. In unseren Versuchen ist die Hemmung in vivo ebenfalls nachweisbar. Auf der Höhe der Hämiglobinämie nach Nitrit und nach Rückbildung des Hämiglobins ist die Aktivität der Karboanhydrase vermindert (vgl. Abb. 2). Die Hemmung geht zeitlich der Erniedrigung der Kohlensäurebindung in der Zelle parallel.

Leicht abspaltbares Bluteisen: Die Werte des mit 1,2%iger Salzsäure leicht abspaltbaren Bluteisens BARKANS zeigten in 7 Versuchen keine Parallelität zur Hämiglobinämie. Die Hemmung des „leicht abspaltbaren Bluteisens" geht der Hemmung der Karboanhydraseaktivität und dem Kohlensäurebindungsvermögen der Zelle weitgehend parallel und ist nach Abklingen der Hämiglobinämie noch nachweisbar. Nach 4 Tagen können die Werte den Ausgangswert wieder erreichen oder sogar überschreiten.

Osmotische Resistenz: Bei Tieren wurde nach Nitritgaben keine Änderung der Resistenz der roten Blutzellen gegen hypotonische Salzlösung beobachtet (Jung). Wir haben bei der experimentellen Nitritbelastung am Menschen die osmotische Resistenz bis zum 6. Tag nach der Belastung täglich verfolgt. Die Neigung der Hämolysekurve war bei (50% Hämolyse) allen Versuchspersonen gleich.

Es hat sich gezeigt, daß die einfache Abstufung in fallenden Konzentrationen von Kochsalzlösung feinere Unterschiede nicht so deutlich erkennen läßt. Wir haben daher mit isotonischer Tyrodelösung ohne Glukose (0,1547 Mol = Isotonie = 1) gearbeitet und die Erythrozytenaufschwemmung zwischen 5,5—6 · 10^8 Erythrozyten pro cm^3 konstant gehalten.

Es ergab sich eine bemerkenswerte Übereinstimmung des Hämolysegrades im steil abfallenden mittleren Teil der Kurve vor Beginn der Versuche und auf der Höhe der Hämiglobinämie. Bis zum 4. Tag nach dem Maximum der Hämiglobinämie war in 50% der Fälle eine geringe parallele Verschiebung des Kurvenabfalls nach links (in Richtung geringerer Molarität des Außenmediums) feststellbar. Stärkere Abweichungen betrafen die beiden Enden der Kurve, wobei die Abweichung im Bereiche geringerer Molarität des Außenmediums etwas früher auftrat (vgl. Abb. 3). Vor dem Versuch und auf der Höhe der Hämiglobinämie war die Hämolysekurve identisch. Nach 24 Std verläuft die Kurve im Ganzen eine Spur flacher, um am 3.—4. Tag nach der Belastung im Bereiche größerer Hypotonie *eine erhöhte Resistenz aufzuzeigen, während gleichzeitig im Bereiche geringerer Hypotonie eine Herabsetzung der Resistenz, d. h. eine vermehrte Hämolyse deutlich wird!*

Diese Tatsache läßt 2 Deutungsversuche zu: 1. Es ändert sich die Erythrozytenpopulation durch vermehrten Abbau und durch Ausschüttung jugendlicher Zellen aus dem Knochenmark, d. h. die Folge einer Oxydation am Blutfarbstoff ist eine Umschichtung der Zusammensetzung, welche bei gleicher Zellzahl die Zeichen einer vermehrten Neubildung und eines vermehrten Abbaues zeigen muß. 2. Die Oxydation wirkt sich an den jüngeren und den älteren Zellen der Erythrozytenpopulation verschieden aus, so daß ein Teil der Zellen resistenter, ein anderer weniger resistent wird, eine Änderung, welche sich jedoch nicht auf der Höhe der Hämiglobinbildung, sondern erst im Verlaufe einiger Tage nach Reduktion des Hämiglobins zeigt.

Eine Retikulozytenvermehrung im Blut haben wir in den Tagen nach der Belastung nicht gesehen. Die Werte des Bilirubins im Serum sanken am 1.—3. Tag meistens um 20% des Ausgangswertes ab. In etwa der Hälfte der Fälle fand sich am 4.—5. Tag eine geringe Vermehrung des Serumbilirubins um 10—20%. Obwohl wir beim Normalen diesen Schwankungen des Bilirubins keine Bedeutung beimessen wollen, da sie innerhalb des Streuungsfehlers liegen, ist die Kongruenz von verminderter osmotischer Resistenz bei höherer Molarität des Außenmediums und der Bilirubinvermehrung doch beachtenswert.

Permeabilität der Zelle: Es ist seit den Untersuchungen von PONDER bekannt, daß der kolloidosmotischen Hämolyse (WILBRANDT) eine Schwellung der Zelle vorausgeht, welche bei Erreichen des „kritischen Volumens" zum Austritt von Hämoglobin führt.

Als Charakteristikum dieses Hämolysetypus wird die photografisch registrierbare Formänderung der osmotischen Schwellungskurve benutzt (JACOBS und PARPART, WILBRANDT). Bei gleichem osmotisch wirksamem Inhalt der Zelle ist der Grad der Schwellung abhängig von der Konzentration der Elektrolyte im Außenmedium, wenn p_H und Temperatur konstant sind. Der osmotisch wirksame Inhalt der Zelle ist abhängig von den im „freien Wasser" der Zelle gelösten Ionen. Nach CRISTOL und BENEZECH macht das „freie Wasser" etwa 50% des Zellvolumens aus und ist von der dispersen Phase des Zelleiweißes — in der Hauptsache vom Hämoglobin, welches etwa 70% gebundenes Wasser und 30% Trockensubstanz besitzt — abhängig. Zwischen dem freien und dem gebundenen Wasser besteht ein Gleichgewicht, welches durch das p_H in der Zelle reguliert wird.

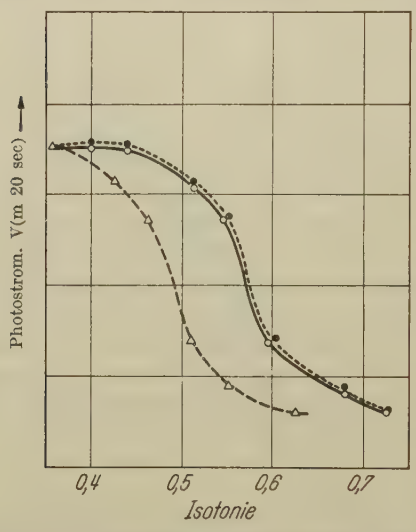


Abb. 4. Photoelektrische Volumzeitmessung von Erythrozyten bei Nitritbelastung. ●----● vor Nitritgabe (HbOH = 0,55% des GesamtHb), ○——○ auf der Höhe der Hämiglobinämie (HbOH = 10% des GesamtHb) und 24 Std nach dem Maximum der Hämiglobinämie (HbOH = 1,6% des GesamtHb) △— — —△. Die Meßpunkte sind jeweils 20 sec nach Schwellungsbeginn abgelesen. Ordinate: fortlaufend photographisch registriertes Volumen. Abszisse: NaCl-Konzentration (1/6 m = Isotonie = 1) mit 1/40 Volumen m/15 SÖRENSEN Phosphatpuffer.

Jede Änderung der Wasserverteilung in der Zelle und zwischen Zelle und Plasma wird sich auf das Volumen der Zelle und ihren Gehalt an freien Elektrolyten auswirken. Verändern alle Zellen einer Erythrozytenpopulation ihr Volumen im gleichen Verhältnis, so resultiert eine charakteristische Exponentialkurve im osmotischen Schwellungsversuch, welche sich je nach der Außenkonzentration oder dem osmotisch wirksamen Zellinhalt parallel verschiebt. Bei experimenteller Nitritgabe zeigt sich nun vor der Hämiglobinbildung und auf der Höhe der Hämiglobinämie eine identische Schwellungskurve in verschiedenen Kochsalzkonzentrationen, d. h. es wird in gleicher Zeit das gleiche Schwellungsvolumen erreicht. In den Tagen nach der Hämiglobinämie, wenn spektroskopisch die Hämiglobinwerte in der Nähe des Ausgangswertes lagen oder den Ausgangswert wieder erreichten, zeigte sich ebenfalls der gleiche Schwellungstypus, nur war die Grenzkonzentration der Schwellung in Richtung geringerer Molarität verschoben. Wie aus Abb. 4 hervorgeht,

ist die Geschwindigkeit des Eindringens von Wasser in die Zelle vor, während und nach Abklingen der Hämiglobinämie die gleiche. Es liegt eine kolloidosmotische Hämolyse im Sinne Wilbrandts vor. *Die Permeabilität der Zelle für schnell eindringende Cl-Ionen ändert sich bei Normalen im Laufe der Hämiglobinämie nach Nitrit nicht, dagegen ändert sich der osmotisch wirksame Inhalt der Zelle.* Die Zeit der Rückbildung dieser Verschiebung ging parallel der Verminderung des Kohlensäurebindungsvermögens der Zelle und war bei den einzelnen Versuchspersonen etwas verschieden. Es ist also auch hier die Abweichung ein einfacher Effekt der p_H-Verschiebung in der Zelle.

Die Änderung des osmotisch wirksamen Inhaltes der Zelle läßt sich auch durch gleichzeitige Bestimmung des spezifischen Gewichtes von Gesamtblut und Serum, der Kochsalzkonzentration und der Kohlensäurebindungsfähigkeit des Serums kennzeichnen. Die Werte aus 2 Versuchen sind in Tab. 2 zusammengestellt. Die Zunahme des spezifischen

Tabelle 2.

Zeit	Hb	HbOH	Spez. Gewicht		Bilir.	NaCl	Alk. Res.	Kalium	Blutz.	Prothrombin
	%	%	Blut	Serum	mg %	mg %	CO_2 Vol%	mg %	mg %	%
0	94	0,9	1,0585	1,0312	1,1	570	48,81	19,02	89	80
Nach 400 mg $NaNO_2$ intravenös:										
1h	91	10,1	1,0600	1,0264	0,94	580	53,56	18,12	78	63
12h	93	2,3	1,0591	1,0296	0,90	570	50,42	18,56	85	74
0	86	0,55	1,0525	1,0284	0,78	580	48,40	18,34	76	96
Nach 600 mg $NaNO_2$ intravenös:										
1h	84	17,5	1,0586	1,0244	0,66	590	54,76	17,80	64	74
6h	85	3,4	1,0542	1,0268	0,70	580	52,01	18,10	70	83

Gewichtes des Vollblutes zugleich mit der Abnahme des spezifischen Gewichtes des Serums zeigt eine Wasserverschiebung an, die Zunahme der Kohlensäurebindungsfähigkeit und der Chloridkonzentration des Serums die Elektrolytverschiebung. Die Abnahme der Serumkaliumkonzentration könnte als „Akkumulationseffekt" gedeutet werden (vgl. Wilbrandt 1938). Es ist jedoch wahrscheinlicher, daß die Abnahme der Kaliumkonzentration im Serum ein Verdünnungseffekt ist.

Als Folge des Wasser- und Elektrolytverlustes der Zelle auf der Höhe der Hämiglobinämie ist eine geringe Abnahme des Hämatokritwertes zu bemerken, sowie eine geringe vorübergehende Abnahme der Erythrozytenzahl (Verteilungseffekt), welche innerhalb der Streuungsbreite liegt. Das Erythrozyteneinzelvolumen, berechnet aus Hämatokritwert und Zellzahl, sinkt auf der Höhe der Hämiglobinämie um 6—7% ab. Die Price Jones-Verteilungskurve der Erythrozytendurchmesser des fixierten Ausstriches zeigte eine geringe parallele Verschiebung des Hauptgipfels nach links. Der Gipfel des mittleren Erythrozytendurchmessers

verlagert sich dabei von 7,4—7,6 μ nach 7,0—7,4 μ. Die errechnete mittlere Erythrozytendicke zeigte Werte von 1,8—2,0 μ, welche sich nicht änderten. Heinzkörperchen wurden während des ganzen Verlaufes nie beobachtet.

Die Prüfung einer biologischen Funktion der roten Zellen, die Höhe des Agglutinationstiters gegen blutgruppenungleiches Serum, zeigte keine signifikanten Unterschiede. Es ergab sich ein Agglutinationstiter der gewaschenen Erythrozyten von $\pm$ 1 : 64 und + 1 : 16 vor der Hämiglobinämie. Im Maximum der Hämiglobinämie und 24 Std später zeigte sich ein Titer von $\pm$ 1 : 32 und + 1 : 16. Das Serum zeigte im Agglutinationsversuch gegen blutgruppenungleiche Testblutkörperchen vor und nach Hämiglobinämie einen Titer von $\pm$ 1 : 128 und + 1 : 64. Die Prüfung der Komplementaktivität des Serums ergab dagegen auf der Höhe der Hämiglobinämie und 24 Std nach ihrem Maximum bei einer Ambozeptorverdünnung von 1 : 100 und 1 : 500 eine Aktivitätsminderung. Während vor der Hämiglobinämie Hämolyse in einer Serumverdünnung von 0,2 eintrat, war diese auf der Höhe der Hämiglobinämie und 24 Std später nur bei einer Serumverdünnung von 0,3 zu beobachten.*

Es hat sich ergeben, daß die Wirkung von Nitrit auf die roten Blutzellen des Menschen in einer Oxydation der chromophoren Gruppe besteht, welche innerhalb 12 Std fast bis auf den Ausgangswert zurückgegangen ist; eine Wirkung auf das Zelleiweiß im Sinne einer diffusen oder herdförmigen Denaturierung (Heinzkörperchen) wurde nicht festgestellt. Eine Anämie entsteht nicht. Obwohl morphologische Zeichen einer Zellschädigung nicht nachweisbar sind, läßt sich zeigen, daß die Funktion der ganzen Zelle nach Abklingen der Hämoglobinämie noch nicht wieder hergestellt ist. Unter der Voraussetzung, daß alle Zellen der Erythrozytenpopulation in gleichem Maße oxydiert werden, ist eine nach einer Latenz von mehreren Tagen erfolgende Änderung der Hämolysekurve auf die sich an die Oxydation anschließende Stoffwechseländerung mit Verschiebung des p_H in der Zelle zu beziehen. Unter der Voraussetzung, daß die Zellen innerhalb der Erythrozytenpopulation in ungleichem Maße oxydiert werden, kann die Änderung der Hämolysekurve ebenfalls Folge eines verschiedenen Stoffwechsels der Einzelzelle sein.

Es sei kurz auf das Verhalten des „leicht abspaltbaren Bluteisens" hingewiesen, da dieser Befund einiges Interesse bietet in Rücksicht auf die bekannte von BARKAN erstmalig gefundene Hemmung des „leicht abspaltbaren Bluteisens" bei der Kohlenoxydvergiftung. BARKAN vertrat die Auffassung, daß die Hemmung des „leicht abspaltbaren Bluteisens" noch nachweisbar sei, wenn Kohlenoxyd Hb spektroskopisch nicht mehr nachgewiesen werden kann. Er glaubte sogar aus diesem Befund eine chronische Kohlenoxydvergiftung charakterisieren zu können. Von KIESE und BLOEMER wurde später gezeigt, daß die Hemmung des „leicht abspaltbaren Bluteisens" nicht mehr besteht, wenn Kohlenoxyd spektroskopisch nicht mehr nachgewiesen werden kann. Die Befunde bei Oxydation des Hb durch Nitrit zeigen dagegen, daß die Eisenabspaltung aus Hämoglobin nicht parallel der Oxydation der

* Diese Untersuchungen wurden von Herrn Dr. SPIELMANN vom Paul Ehrlich-Institut Frankfurt/M. ausgeführt, dem auch an dieser Stelle gedankt sei.

prosthetischen Gruppe des Hb verläuft, sondern abhängig ist vom p_H im Zellinneren. Dieses zeigt noch eine Verschiebung, wenn die Farbstoffgruppe bereits reduziert ist.

Die nach Abklingen der Hämiglobinämie noch nachweisbare klinische Zyanose dürfte nicht bedeutungslos für die Sauerstoffversorgung der Gewebe — besonders bei Steigerung des O_2-Bedarfes während der Arbeit — sein, eine Warnung, welche bereits von RIMINGTON ausgesprochen worden ist.

Zusammenfassung.

Es wurde bei 10 gesunden Versuchspersonen der Ablauf einer durch intraduodenale oder intravenöse Applikation einer 10%igen Natriumnitritlösung gesetzten Hämiglobinämie untersucht. Innerhalb 1 Std entsteht ein Maximum der Hämiglobinämie, welches im Laufe von 12 Std bis auf Werte an der oberen Grenze des Normalwertes zurückgebildet wird. Die Dosiswirkungskurve hat einen linearen Verlauf.

Das Kohlensäurebindungsvermögen der Zellen, welches auf der Höhe der Hämiglobinämie herabgesetzt ist, vermindert sich nach der Reduktion noch weiter und zeigt 24—72 Std später noch eine Herabsetzung von 20—30%. Der Stoffwechsel der Zelle als H-Ionen liefernder Prozeß ist nach Reduktion des Hämiglobins Ursache einer p_H-Verschiebung in der Zelle. Solange diese p_H-Verschiebung besteht, ist die Aktivität der Karboanhydrase und der Wert des „leicht abspaltbaren Bluteisens" vermindert, die Sauerstoffdissoziationskurve meionektisch und der osmotisch wirksame Inhalt der Zelle vermindert.

Die Permeabilität der Zelle für schnell eindringende Molekeln ändert sich nicht während des Ablaufes der Hämiglobinämie. Die Permeabilität für Hämoglobin zeigt geringe Differenzen, welche vermuten läßt, daß die der Oxydation folgende Stoffwechseländerung nicht in allen Zellen gleichartig ist.

Literatur.

ABDERHALDEN, E.: Z. physiol. Chem. **25**, 65 (1898). — ALLEN, v.: J. Labor. a. clin. Med. **10**, 1027 (1925). — Münch. med. Wschr. **1926**, 1890. — BARKAN, G.: Z. physiol. Chem. **148**, 124 (1925). — BARKAN, G., u. O. SCHALES: Z. physiol. Chem. **248**, 96 (1937). — BARKAN, G., and B. S. WALKER: J. of biol. Chem. **135**, 1 (1940). — BLOEMER, K.: Pharmazie **1**, 7 (1946). — BLOEMER, K., u. M. KIESE: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 377 (1947). — BOROS, J. v.: Z. inn. Med. **1948**, 351. — BRINKMANN, R.: J. of Physiol. **80**, 171 (1933). — CRISTOL et M. C. BENEZECH: Gaz. méd. France **54**, 699 (1947). — DARLING, R. C., and F. J. L. ROUGHTON: Amer. J. Physiol. **137**, 56 (1942). — GOETZE: Zit. bei E. PONDER, Protoplasma Monogr. Berlin: Gebrüder Borntträger 1934. — HAVEMANN, R., F. JUNG, u. B. v. ISSEKUTZ jr: Biochem. Z. **301**, 116 (1939). — HEILMEYER, L.: Hdb. d. inn. Medizin, Bd. II, Blutkrankheiten. Berlin 1942. — HEUBNER, W.: Erg. Physiol. **43**, 9 (1940). — Klin. Wschr. **1941**, 137. — Dtsch. med. Wschr. **1943**, 387. — HEUBNER, W., M. KIESE, M. STUHLMANN, u. W. SCHWARTZKOPFF-JUNG: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 313 (1947). — ISSEKUTZ, v. jr: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **193**, 551, 567, 569

(1939). — Jacobs, M. H.: Vgl. Permeability in Ann. Rev. Physiol. **1** (1939). — Jung, F.: Klin. **1942**, 917; **1947**, 459. — Kawe, A.: Dtsch. med. Wschr. **1946**, 266. — Kiese, M.: Klin. Wschr. **1946**, 81. — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 288 (1947). — Kiese, M., and A. B. Hastings: J. of biol. Chem. **132**, 267, 281 (1940). — Kiese, M., u. W. Schwartzkopff: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 267 (1947). — Kramer, B., and F. F. Tisdall: J. of biol. Chem. **46**, 339 (1921); **53**, 241 (1922). — Lowry and Hastings: J. of biol. Chem. **143**, 257 (1942). — Ponder, E.: Protoplasma Monogr., Bd. 6. The mammalian red cell. Berlin: Gebrüder Bornträger 1934. — Rimington, Claude: Annual Rev. Biochem. **12**, 425 (1943). — Wendel, M. B.: J. clin. Invest. **18**, 179 (1939). — Wilbrandt, W.: Erg. Physiol. **40** (1938). — Pflügers Arch. **241**, 289 (1939); **250**, 569 (1948). — Helvet. physiol. Acta **6**, 234 (1948). — Wyman, Jeffries: Heme Proteins in Advances in protein chemistry, Bd. IV. New York: Academic press 1948.

Dr. Peter Moser, (16) Frankfurt a. M., Med. Univ. Klinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 71—90 (1950).

Aus der Med.-parasitolog. Abteilung des Pharmakologischen Instituts der Universität Bonn und dem Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt Köln in Krefeld.

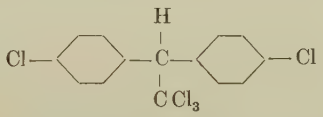
Über die Wirkung des Kontakt-insecticiden Handelspräparates „Gix" auf Ratten und Mäuse.

Von

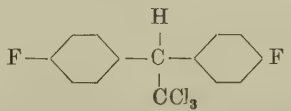
GERH. PIEKARSKI und K. HOLZ.

(Eingegangen am 30. September 1949.)

Seit dem Jahre 1943 sind neuartige insekticide Kontaktgifte vom Typus der sogenannten Gesarol-Gruppe (kurz: DDT-Präparate genannt) in ständig steigendem Maße zur Bekämpfung landwirtschaftlicher, humanwie veterinär-medizinischer Schädlinge angewandt worden. In Deutschland wird neben den Präparaten, die den Wirkstoff als Chlor-Verbindung (Dichlor-Diphenyl-Trichlormethylmethan im Folgenden als DDT bezeichnet) enthalten,



auch ein Fluorpräparat hergestellt, das in großem Umfange und zum Teil systematisch zur Bekämpfung von Fliegen, insbesondere von Stallfliegen, verwendet und unter der Handelsbezeichnung „GIX" hergestellt wird. Der Wirkstoff enthält zum Teil an Stelle von Chlor das Element Fluor — die chemische Formel ist jedoch bisher noch nicht publiziert worden. Vielleicht ist sie der von RIEMSCHNEIDER angegebenen Formel einer Fluorverbindung (DFDT) ähnlich.



Dieses Präparat, ebenso wie die Chlorverbindung wasserunlöslich, ist in Öl aufgenommen. Mit einem Emulgator versetzt, läßt es sich mit Wasser mischen und wird durch Spritzen auf die Wände gebracht oder zur Behandlung von Körperungeziefer, z. B. bei Hunden, Schweinen, Mäusen und Ratten, auf den Tieren verrieben. Es hat auf die Insekten eine außerordentlich sicher abtötende Wirkung und behält seine hohe Wirksamkeit durch seinen geringen Dampfdruck bis zu mehreren Wochen bei.

Die zeitweiligen Schwierigkeiten bei der Beschaffung geeigneter Mittel zur Beseitigung eines Krätzefalles führten zu eigenen Versuchen, durch Behandlung der befallenen Haut mit einer „GIX"-haltigen Salbe oder einer „GIX"-Emulsion die Krätzemilben zu beseitigen. Die gute

Wirkung des Präparates z. B. auf Hühnermilben berechtigte zu dieser Vermutung. Die Erfolge (unpubliziert) waren jedoch nicht so eindeutig, wie sie im Jahre 1946 von Mülhens erzielt wurden. Insbesondere bestätigte sich dabei die auch von Mooser beschriebene Wirkungslosigkeit der wirkstoffhaltigen *Salbenpräparate*. Daher wurden vorerst systematische Versuche mit „GIX" an Ratten vorgenommen, die mit der Krätzemilbe *Notoedres alepis* befallen waren. Aber bei den ersten orientierenden Prüfungen, bei denen die Ohren der Tiere mit dem *unverdünnten* Präparat bestrichen wurden, starben sämtliche Tiere unter Erscheinungen, die auf eine Schädigung des Zentralnervensystems schließen ließen.

Da diese Beobachtung im Gegensatz zu der oft betonten Unschädlichkeit der DDT-Prapärate auf den Warmblüter-Organismus stand (Domenjoz, Krüpe und Emmel u. a.) schien es angezeigt, die Wirkung des Präparates „Gix" auf Laboratoriumstiere zu prüfen. Eine weitere Begründung für diese Untersuchungen wurde in der Tatsache gesehen, daß die ständig mit „Gix"-Emulsionen praktisch Tätigen (Techniker, Schädlingsbekämpfer) gelegentlich über Kopfschmerz, Benommenheit und ähnliche Beschwerden klagten, die sie mit einer toxischen Wirkung des Präparates in Verbindung brachten.

Material und Methodik.

Der reine Wirkstoff, der im Handelspräparat „Gix" enthalten ist, stand uns nicht zur Verfügung, weil er nach einer Auskunft der Herstellerfirma im Fabrikationsgang nicht isoliert anfällt. Es lag uns jedoch auch gerade daran, eine Prüfung des Handelspräparates vorzunehmen, so daß sich alle im folgenden mitgeteilten Versuche auf dieses beziehen. Es enthält 60% Wirkstoff, d. h. 100 g „Gix" = 60 g Wirkstoff. (Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich die Mengenangaben auf 20 g Maus und Wirkstoffgehalt.) Die Bestimmung des spezifischen Gewichtes ergab pro cm^3 1,21 g. Da bei den Versuchen stets von Volumenprozenten ausgegangen wurde, mußten die gewonnenen Werte jeweils um $^1/_5$ erhöht werden, um zu vergleichbarem Wirkstoffgehalt der verwandten Lösungen und Emulsionen zu kommen.

Wir untersuchten vorwiegend Mäuse und Ratten, die wir teils perkutan, teils intraperitoneal und oral mit „Gix" behandelten. Die hohen Kosten für die Laboratoriumstiere und die Schwierigkeiten ihrer Beschaffung zwangen uns zur zahlenmäßigen Einschränkung der Versuchsreihen. Dennoch geben sie wohl ein eindeutiges Bild von der Wirkung des „Fluor-Gesarols" auf die Versuchstiere.

Das Präparat „Gix" wurde zum Teil unverändert, zum Teil mit Wasser emulgiert angewendet. Den Versuchstieren brachten wir das Präparat oral mit Hilfe der Schlundsonde (Uretherenkatheter) und einer Rekordspritze (Tuberkulinspritze) bei. Es wurde in der Regel gut aufgenommen. Erbrechen trat niemals ein.

Bei den pathologisch-histologischen Untersuchungen verwendeten wir vorwiegend die üblichen Färbemethoden (Hämatoxylin-Eosin; van Gieson). Als Besonderheit wurde zusätzlich die Nissl-Färbung für die Gehirnschnitte benutzt. Das in Alkohol fixierte Material wurde mit Gelatine aufgeblockt. Die gefertigten Schnitte sind über Nacht bei 37° in Alkohol aufbewahrt, dann in 1%iger Cresylviolettlösung 1½ Std im Brutschrank bei 56° gefärbt, in 96%igem Alkohol differenziert und über Xylol in Kanadabalsam eingebettet worden.

I. Teil

Zur Toxikologie von „GIX" und verwandten Präparaten.

Über toxikologische Untersuchungen mit dem Kontakt-Insektizid „GIX" sind unseres Wissens nur spärliche Angaben veröffentlicht.

Mülhens machte einige orientierende Versuche an Mäusen und fand 2, 5, 10 und 15 mg „Gix" bei weißen Mäusen ohne Wirkung. Täglich 0,2 g einer 20%igen „Gix"-Emulsion auf der enthaarten Haut verrieben, führte bei Mäusen nach 6—10 Tagen zum Tode. — K. Mülhens (1946) teilte ferner Erfahrungen mit, die er mit diesem Präparat bei der praktischen Anwendung in Südeuropa sammeln konnte. Bei der Bekämpfung verschiedener Insekten durch Spritzen und Vernebeln trat bei den Arbeitern ein kräftiger Nasen-Rachen-Reiz auf, der aber relativ schnell wieder verschwand. Ein sonst gesunder 38jähriger Mann bekam allerdings zweimal nach dem Verspritzen von „Gix"-Emulsion mit Hilfe einer Spritzpistole ohne Atemschutz einen geringen Nasen-Rachen-Reiz, aber 6—8 Std später einen heftigen Brechdurchfall. Die Erscheinungen klangen nach 4 Std ab und Nachwirkungen traten nicht auf. 3 Wochen später arbeitete der gleiche Mann in gleicher Weise mit „Gix" und bekam wiederum einen Brechdurchfall. Andere Personen, die mit Schwebstoff-Filter als Atemschutz arbeiteten, erkrankten nicht. Frisch mit 1%iger Emulsion getränkte und getrocknete Schlafnetze riefen einen Nasen-Rachen-Reiz beim Schläfer wenigstens in den ersten Nächten hervor. Bei Verwendung von Gesarol-Emulsion wurde diese Reaktion nicht beobachtet. Mülhens führt die Erscheinung auf den Fluorgehalt des Präparates zurück, denn bereits kleinste Fluormengen wirken bei wiederholter Aufnahme stark giftig und führen zu nachhaltigen Störungen des Kalkstoffwechsels.

R. Domenjoz (1946) und R. Riemschneider (1947) führten unter den wichtigsten Kontaktgiften die bereits eingangs erwähnte Fluorverbindung, das *Difluor*diphenyl*trichlor*methylmethan an, es ist aber, wie erwähnt, nicht bekannt geworden, ob der Wirkstoff im „Gix" mit dieser Substanz identisch ist.

Riemschneider gibt an, daß die Toxizität dieser genannten Fluorverbindungen für höhere Lebewesen (verglichen mit dem Chlor-DDT-Wirkstoff) nicht steigt, obwohl sie erheblich größere Kontaktwirkung und Initialtoxizität für Insekten als die Chlorverbindung besitzt. Versuche an Mäusen ergaben, daß bei einmaliger Injektion die Fluorverbindung nicht giftiger als der DDT-Wirkstoff ist. 2,5 und 15 mg der reinen Fluorverbindung wurden von weißen Mäusen gut vertragen. Für die Fluorverbindung des DDT, bei der die beiden Chloratome in der p-Stellung durch Fluor ersetzt sind, gibt Domenjoz (1946) als Dosis letalis 50% = 0,44 g/kg (d. s. 8,80 mg/20 g Maus) gegenüber 0,4 g (d. s. 8 mg 20 g Maus) für die Chlorverbindung, also geringere Toxizität für die Maus bei größerer insektizider Wirkung, an. Riemschneider erwähnt noch eine amerikanische Arbeit (aus dem J. vet. med. Assoc. 109, 274, 1946) in der über einen ähnlichen fluorhaltigen Wirkstoff der DDT-Gruppe berichtet wird. Leider ist weder der Autor angegeben, noch die Arbeit zugänglich. Velbinger (1947) zitiert nach dieser Arbeit, daß die Fluorvergiftung für Warmblüter weniger giftig sein soll als das DDT.

Damit ist die zur Zeit zugängliche Literatur über die DDT-*Fluor*verbindung bereits erschöpft. Die Angaben über die Toxizität der *Chlor*verbindungen sind in den beigegebenen Tabellen, für Mäuse und Ratten getrennt, zusammengestellt worden. Die von den verschiedenen Autoren angegebenen DDT-Mengen wechseln von Tierart zu Tierart und stimmen auch nicht für die gleichen Tierarten überein. Am auffallendsten sind die

Unterschiede zwischen den Ergebnissen von Emmel und Krüpe (1947) einerseits und den übrigen angeführten Autoren bei anderer als oraler Applikationsart. Emmel und Krüpe halten es für möglich, daß z. B. Domenjoz eine perorale Aufnahme von DDT bei ihren Versuchstieren (Ablecken an der Injektionsstelle) übersehen habe, weil er keine DDT-Testung des Mageninhaltes vorgenommen habe. Da keine Einzelheiten über die toxikologischen Untersuchungsmethoden mitgeteilt sind, läßt sich die Diskrepanz der Befunde nicht erklären. Es scheint aber wohl festzustehen, daß eine intraperitoneale bzw. subkutane Applikation doch bereits bei geringeren Mengen wirksam wird als von Emmel und Krüpe angegeben wurde (vgl. Tabelle S. 83).

Die Toxizität des Wirkstoffes ist in kristallisiertem Zustand besonders gering, weil die Wasserlöslichkeit außerordentlich schwach ist. Nach Gavaudan und Poussel ergab die nephelometrische Bestimmung der Löslichkeit von DDT in Wasser den Wert von 0,001/1000 bei 18° (28×10^{-8} g mol/1); mit der Erhöhung der Resorptionsmöglichkeit wächst die Toxizität. Sie wird durch Lösung des Wirkstoffes in Öl wesentlich erhöht. Die Resorption ist aber auch innerhalb des Körpers unterschiedlich. Hoffmann und Lendle (1948) verabreichten an Ratten DDT in Verreibungen mit Gummiarabikum oral bis zu 1000 mg/kg, also in *wäßriger* Suspension, ohne daß irgendwelche pathologischen Erscheinungen auftraten. Nach *intraperitonealer* Gabe von Mengen über 100 mg/kg war der Ausgang der Vergiftung letal. Die tödliche Dosis wurde mit etwa 200 mg/kg bei i. p. Applikation errechnet. Sie liegt damit etwas höher als beim Kaltblüter. Für den Maikäfer genügten 20—30 mg/kg — die DDT-Wirkung ist also auch bei Insekten als Dosis-abhängig anzusehen.

Eine direkte Wirkung *auf die Haut* von DDT ist nicht beschrieben worden, jedoch gelingt es *über die Haut*, perkutan, Vergiftungserscheinungen mit tödlichem Ausgang herbeizuführen, wenn man den Wirkstoff in Öl löst. Buxton erwähnt, daß selbst in Wunden gebracht die Heilung durch DDT nicht beeinträchtigt wird. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß der Wirkstoff in einer Gewebekultur keinerlei Hemmungen des Wachstums mit sich bringt (Lewis und Richards 1945). Dagegen führte der Wirkstoff in Dimethylphtalat oder Dibuthylphtalat gelöst (25—30%) bei einer Einwirkungsdauer von 1×24 Std regelmäßig zu Vergiftungserscheinungen, ohne jedoch zum Tode zu führen. Sehr häufige Einreibungen mit solchem 30% Wirkstoff enthaltenden Lösungen führten zu Appetitlosigkeit und schlechtem allgemeinen Befinden. Tod trat wohl nur durch Sekundärinfektionen ein.

Von besonderem praktischem Interesse ist die Frage, ob die DDT-Nebel und Sprays auf die Atmungsorgane der Techniker (Schädlingsbekämpfer) einwirken können. Die verschiedenen Untersuchungen an Tieren und Menschen — die Versuchspersonen wurden einer „Batterie von psychophysischen Tests" unterworfen (Buxton) — ergaben aber insgesamt eine nur geringe Wirkung. Lösungen des DDT in Ölen (fatty oils) erhöhten die Giftwirkung. Dagegen tragen die DDT-Stäube (10%) (zur Entlausung der Kleider und des Körpers) keine ernste Gefahr in sich wegen der zu geringen Löslichkeit des Wirkstoffes in Wasser und der relativen Größe der Staubteilchen, die die Alveolen nicht erreichen (Neal, v. Öttingen u. a. 1944). Dagegen berichtet Velbinger von einem Arzt, der mehrere Tage hindurch in einer DDT-Wolke arbeiten mußte, daß er schwere Atembeschwerden und Schmerzen in seinem Drüsensystem bekam, so daß er seine Tätigkeit aufgeben mußte. Erst nach einigen Wochen waren die Vergiftungserscheinungen behoben. Wahrscheinlich waren größere Mengen DDT-haltigen Staubes über die Lungen in den Organismus gelangt.

Buxton (1945) steht auf dem Standpunkt, daß massive Dosen von DDT zu toxischen Erscheinungen führen. Man sollte es daher nur anwenden, wenn starke Verunreinigungen von Nahrungsmitteln vermieden werden können.

Velbinger (1947) hat diese Auffassung durch Selbstversuche und Versuche an freiwilligen Mitarbeitern bestätigt. 250 mg Wirkstoff wurden nahezu reaktionslos vertragen. Wurde DDT in Öl gelöst gegeben, stellte sich eine leichte Hyperästhesie ein, die auch bei 500 mg nicht wesentlich gesteigert war. 750 mg führte zu Sensibilitätsstörungen in der unteren Gesichtshälfte. Es stellte sich unsicherer Gang und torkelnde Bewegung ein, die 6 Std nach einer oralen Gabe ihren Höhepunkt erreichte. 24 Std später führten 111 mg zu keiner stärkeren Reaktion, es trat jedoch ein ernstes klinisches Bild auf bei 1500 mg. Velbinger schildert von sich: Prickeln in der Haut der unteren Gesichtshälfte (Zunge, Lippe, Kinn), Gleichgewichtsstörungen, Schwindel und Benommenheit. Diese Symptome traten nach 4—5 Std auf, klangen ab und kamen nach 2—3 Std wieder, um wiederum nach 2—3 Std zu verschwinden. Es setzte ein eigenartiger Tremor in allen Gliedmaßen ein, der nach insgesamt 10 Std seinen Höhepunkt erreichte. Es trat starkes Übelkeitsgefühl auf, Kopfschmerzen, Gleichgewichtsstörungen und Zittern und einige Kloni der Hände, dabei sogenannte „Pfötchenstellung". Nach einer Stunde mußte sich Velbinger erbrechen, dem Erleichterung des Gesamtbefindens folgte. Danach schlief er 12 Std und erwachte bei gutem Allgemeinbefinden und normalem Appetit. Es blieb noch vorübergehend eine Sensibilisierung der Umgebung des Mundes sowie am Fuß und der distalen Unterschenkelhälfte ohne genaue Abgrenzung nach proximal hin.

Das Blutbild ergab einen leichten Abfall des Hämoglobingehaltes um 15—18% ohne sonstige Veränderungen. Bei Versuchstieren wurde vielfach eine Leukozytose festgestellt, bei allerdings stärkeren Vergiftungserscheinungen, die schließlich zum Tode führten (Katze).

Eigene Untersuchungen

Die Folgen der „Gix"-Wirkung bestanden darin, daß Mäuse oder Ratten je nach applizierter Dosis früher oder später zunächst ein leichtes Zittern zeigten, das am Kopf einsetzte, mehr und mehr zunahm, den ganzen Körper erfaßte und in heftige Krämpfe übergehen konnte. Die Vergiftung führte zu einer Lähmung — zunächst der Vorder- und dann der Hinterextremitäten, zu Seitenlage des Tieres, die in völlige Bewegungsunfähigkeit überging — und schließlich zum Tode, dessen Zeitpunkt sich oftmals nur schwer eindeutig feststellen ließ.

Die ersten Symptome bei den Warmblütern waren bei den geringsten noch wirksamen Dosen oftmals reversibel*, meist folgte dann aber doch, ohne erkennbare zentralnervöse Störungen, vorzeitiger Tod.

* Bei Insekten wird im allgemeinen eine „Alles oder Nichts"-Wirkung angegeben. Tatsächlich sterben z. B. Fliegen und Mücken meist dann, wenn sie Symptome der Giftwirkung erkennen lassen. Größere Insekten (Schaben der Art Blatta orientalis) dagegen können sich ebenso erholen, wie z. B. Mäuse. Allerdings muß die applizierte Menge kontrolliert gegeben werden, z. B. an einem Tarsus oder zweien. Dann treten Reaktionen auf (Störung des Laufens, Stelzbeinigkeit u. a.), die nach einigen Stunden oder wenigen Tagen zurückgehen können (darüber genaue Einzelheiten a. a. O.). Im Gegensatz zu Läuger u. Mitarb. halten Wiesmann (1943) und Schneider (1944) bei Insekten eine reversible Lähmungserscheinung nicht für ausgeschlossen und Velbinger hat „Erholung nur selten beobachtet". Deutliche Erholung zeigen die „DDT-festen" Fliegen von Arnäs (Wiesmann).

1. Mäuseversuche.

Die völlig unschädliche einmalige orale Gabe liegt bei 2,9—3,6 mg Wirkstoffgehalt auf 20 g Körpergewicht. *Einmalige orale* Gabe von 7,2 mg führte noch nicht regelmäßig zu deutlichen Symptomen, aber meist zu vorzeitigem Tode, d. h. gegenüber Kontrolltieren, die 8 Tage und länger am Leben blieben, starben die behandelten Mäuse zum Teil innerhalb der ersten 3 Tage. Die einmalige orale Dosis letalis/50% wurde mit 9,6 mg pro 20 g Maus und 480,0 mg/kg (Tab. 1) berechnet, die Dosis min. eff. mit 4,3 mg/20 g Maus.

Tabelle 1. *Bestimmung der letalen Dosis bei einmaliger oraler Gabe.* Spezif. Gewicht: 1 cm^3 g = 1,2124 = 0,73 mg Wirkstoff.

Appliz. Dosis (Wirkstoff-Menge)	Zahl der Tiere	davon lebend	davon tot
2,9 mg	5	5	0
5,3 mg	5	4	1
8,6 mg	5	3	2
9,6 mg	4	1	3
12,0 mg	5	1	4
14,4 mg	5	1	4
18,0 mg	5	0	5

Dosis let. 50% = 9,60 mg/20 g Maus = 480 mg/kg (Dosis min. eff. 50% wurde mit 4,3 mg/20 g Maus bestimmt).

Einmalige Wirkstoffmenge von etwa 11 mg und mehr führte immer zu irreversiblen schweren zentralnervösen Erscheinungen und schließlich zum Tode. Dabei war die Zeit zwischen Versuchsbeginn und Tod des Versuchstieres im Ganzen betrachtet abhängig von der verabreichten Wirkstoffmenge, jedoch waren die individuellen Schwankungen außerordentlich groß. Hinzu kommt allerdings, daß die Emulsion sehr schwer ganz homogen zu erreichen war und durch geringe Niederschlagbildung unvermeidliche Unregelmäßigkeiten bei der Dosierung vorkamen. Wenn man von diesen Fehlerquellen absieht, so läßt sich soviel aussagen, daß die geringsten immer letalen Dosen von etwa 10,8 mg Wirkstoff innerhalb von 30—35 Std zum Tode führen, 72—108 mg innerhalb von 5—10 Std, 144—180 mg innerhalb von 3—5 Std. Dabei wirkt das Präparat anscheinend emulgiert etwas stärker als die gleiche Wirkstoffmenge in der Originalkonzentration gegeben. Bei einem vergleichenden Versuch wurde je 5 Mäusen einmal das konzentrierte Original-Präparat „Gix" und daneben die gleiche Wirkstoffmenge (72 mg) als 25% Emulsion oral appliziert. Es bestätigte sich der bereits angedeutete Unterschied.

Die Wirkung des Präparates „Gix" ist also bei gleichem Wirkstoffgehalt nicht ganz unabhängig von der Konzentration. Mit Wasser emulgiert erwiesen sich die Emulsionen etwas giftiger als die unverdünnte Stammlösung. Jedoch ließ sich der immer wieder *biologisch* feststellbare

Tabelle 2. *Gleiche Wirkstoffmenge 72 mg pro 20 g Körpergewicht oral gegeben, zum Teil als Original-Präparat, zum Teil als 25% Emulsion.*

Nr.	Datum	Körper-gewicht	Gixmenge absol.	Konzentration	Tod nach Stunden
1	27. 4. 48	27 g	0,135 cm³	Original	5 Std
2	„	25 g	0,125 „	„	7½ „
3	„	28 g	0,140 „	„	5 „ 6,6 Std
4	„	26 g	0,130 „	„	8 „
5	„	28 g	0,140 „	„	7½ „
6	„	25 g	0,5 „	25% Emulsion	4 „
7	„	29 g	0,58 „	„	6½ „ 5,5 Std
8	„	26 g	0,52 „	„	6½ „ 5,5 Std
9	„	29 g	0,58 „	„	4 „
10	„	32 g	0,64 „	„	6½ „

Unterschied *statistisch* nicht sichern. Man darf annehmen, daß die Möglichkeit zur Resorption des Wirkstoffes durch die Emulgierung anscheinend verbessert wird.

Wurden *täglich* 3,6 mg Wirkstoff verabreicht, so traten in den ersten Tagen meist ebenfalls keine Symptome auf, aber die Tiere starben sämtlich vorzeitig nach 3—5 Tagen, in einem Falle (Tier VIII, 4) stellten sich nach der 4. Gabe die charakteristischen Symptome ein, sie gingen aber innerhalb von 24 Std zurück, das Tier starb jedoch kurz darauf am 6. Tage. Der vorzeitig eingetretene Tod läßt erkennen, daß auch die als Einzeldosis unwirksamen Mengen mehrfach gegeben, schädigend wirken und damit eine geringe *Kumulation* des Wirkstoffes erkennbar wird. In einem Falle (Maus 41) wurden 9 Tagesgaben (4,3 mg pro die) vertragen, ohne daß schwere zentralnervöse Erscheinungen auftraten. Dann starb das Tier. 2 Mäuse mußten 6mal Gaben von täglich 4,3 mg erhalten, bis dann unter den für „Gix-"Wirkung charakteristischen Symptomen der Tod eintrat. Die Dosis letalis 50% *mehrfach täglich gegeben*, liegt bei 1,4 mg/20 g bzw. 72 mg/kg (Tab. 3).

Tabelle 3. *Bestimmung der letalen Dosis bei mehrmaliger oraler Gabe.*

Appliz. Dosis (Wirkstoff-Menge)	Zahl der Tiere	davon lebend	davon tot
0,6 mg	5	5	0
1,2 mg	5	2	3
1,8 mg	5	0	5

Dosis let. 50% = 1,4 mg/20 g Maus = 72 mg/kg.

Diese Kumulation tritt bei nur wenig höheren Tagesdosen deutlicher in Erscheinung. So zeigte z. B. die Maus 40 (Tagesmenge 8,6 mg) am 2. Tage ein leichtes Zittern, das wieder zurückging, am 3. Tage (nach 3. Gabe) waren keine Symptome zu beobachten. Erst am 4. Tage wurde das Tier am Morgen in schwersten Krämpfen gefunden und getötet.

Brotfütterung.

In 2 Versuchsreihen wurde den Mäusen mit „Gix" getränktes Brot verabreicht. Jedes Tier bekam 1 Stück Brot (etwa 5 g), das insgesamt 0,1 cm³ „Gix" (= 72,0 mg Wirkstoff) enthielt. Entsprechend den Versuchen mit genau abgemessenen oralen Gaben starben alle 5 Tiere innerhalb einer Nacht. Eine 2. Reihe von 5 Tieren erhielt neben „Gix"-haltigem Brot unvergiftetes Körnerfutter. 4 von den Tieren überlebten 2 Tage, starben dann am 3. Tag unter den typischen Erscheinungen. Da die Mäuse trotz des Körnerfutters von dem „Gix"-haltigen Brot gegessen hatten, läßt sich vielleicht der Wirkstoff oder „Gix" selbst als Mäuse-Gift verwenden.

Intraperitoneal appliziert

ergaben bereits 1,4 mg bzw. 3,6 mg Wirkstoffgehalt bei 2 sehr kleinen Tieren (13 g bzw. 14 g Körpergewicht) leichte, reversible Erscheinungen, nach denen Maus Nr. 12 auch vorzeitig starb. 7,2 mg Wirkstoff wurden bei 25 g schweren Tieren zum Teil noch ohne erkennbare Schädigung, zum Teil unter reversiblen Erscheinungen vertragen. Eine höhere „Gix"-Menge führte in der Regel unter den typischen Symptomen zum Tode. Allerdings waren gelegentlich einzelne Mäuse so widerstandsfähig, daß sie selbst bei verhältnismäßig hohen Wirkstoffmengen (72 mg) nicht erkrankten. Die Ursache hierfür ließ sich nicht feststellen. Die Dosis let/50% liegt bei 8,0 mg/20 g (= 400 mg/kg) (Tab. 4).

Damit erscheint die intraperitoneale Applikation wirksamer als die oralen Gaben. Statistisch ließ sich der Unterschied wegen zu geringer Tierzahlen nicht sichern.

Tabelle 4. *Bestimmung der letalen Dosis bei einmaliger intraperitonealer Gabe.*

Appliz. Dosis (Wirkstoff-Menge)	Zahl der Tiere	davon lebend	davon tot
1,4 mg	5	5	0
3,6 mg	5	4	1
7,2 mg	5	2	3
9,6 mg	5	0	5

Dosis let. 50% = 7,5 mg/20 g Maus = 375 mg/kg

Perkutane Anwendung.

Von Interesse war die Frage nach der Wirkung auf die Körperoberfläche, auf die rasierte Haut. Für diese Prüfung wurde Mäusen ein kleines rechteckiges Feld von der Größe 1 × 1, bzw. 1 × 2 cm auf der Mitte des Rückens ausrasiert und mit mittleren Mengen unverdünnten „Gix" (45—72 mg) bestrichen. Durch vorsichtige Fesselung wurden die Tiere daran gehindert, die bestrichene Haut zu berühren oder zu belecken, so daß eine orale Aufnahme ausgeschlossen werden konnte. Nach etwa 6—8 Std traten die ersten nervösen Störungen auf, die grundsätzlich ebenso abliefen, wie bei oraler oder intraperitonealer Applikation. Auffallend war die bevorzugte Schädigung der Extremitäten, die sich in einer starken Lähmung, zuerst der Hinterbeine, die schlaff nach hinten gerichtet waren und unbeweglich wurden, auswirkte. Nach 21—44 Std führte auch die perkutane Behandlung unter den üblichen Erscheinungen einer zentralnervösen Störung zum Tode. Die genaue Dosis letalis/50% wurde nicht bestimmt.

2. Versuch mit Ratten.

Die Versuche mit Ratten waren nur in kleinem Rahmen durchführbar, blieben nur orientierender Natur, um einen Vergleich mit den

Mäusen zu gewinnen. Es wurde dabei von der Erfahrung ausgegangen, daß etwa 3,6 mg Wirkstoff einmal oral gegeben von Mäusen immer gerade noch vertragen wurden. Entsprechend wurden zunächst die bei Mäusen wirksamen Dosen auf das Körpergewicht der Ratten umgerechnet, so daß die 20 g-Dosis der Maus bei einer 120 g schweren Ratte mit 6 multipliziert — als äquivalent angesehen wurde (= 1 Mäuse-Einheit = ME).

Es zeigte sich, daß 1 Mäuseeinheit bei der Ratte ohne erkennbare Wirkung blieb. Aber bereits 1½ ME konnten zu relativ schnellem irreversiblem Schaden führen, ebenso natürlich höhere Dosierungen. Aber anscheinend sind die individuellen (konstitutionellen ?) Unterschiede auch bei Ratten sehr groß. So zeigte eine Ratte nach 3 ME „Gix" nur reversible Störungen, eine zweite ebenfalls wiederholt auftretendes leichtes Zittern, verbunden mit starker Schreckhaftigkeit. Die Tiere überlebten jedoch die Gixdosen. So ergibt dieser Vergleich, daß die schädigenden oralen Gaben von „Gix" bei Mäusen und Ratten offenbar in der gleichen Größenordnung liegen.

Ausgehend von der eingangs erwähnten Beobachtung, daß die Bestreichung der Ohren mit „Gix" zu starken Schädigungen führte, wurde die geringste perkutan an der Ohrmuschel wirksame Dosis festzustellen gesucht. Ratten zeigten typische Erscheinungen, wenn die beiden von Milben befallenen — also gleichsam skarifizierten — Ohrmuscheln mit insgesamt 0,1 cm³ (= 72 mg Wirkstoff) unverdünnten „Gix" bestrichen wurden. Die Tiere begannen nach 24 Std charakteristisch zu zittern und gingen innerhalb von 48 Std zugrunde. Geringere Mengen blieben ohne erkennbare Wirkung.

In Anlehnung an die Untersuchungen von Läuger, Pulver und Montigel wurden bei einigen Ratten der Blutzuckerspiegel und die Leukozytenzahl im Verlauf einer akuten „Gix"-Vergiftung geprüft. Wie das Beispiel (Tab. 5) zeigt, folgt einem leichten Anstieg des Blutzuckerge-

Tabelle 5. *Blutzuckergehalt und Leukozytenzahl* nach einmaliger oraler „Gix"-Gabe Gewicht der Ratte 160 g, Wirkstoff-Menge 140 g.

Blutzuckergehalt	Klinisches Bild	Leukozytenzahl
vor Versuchsbeginn 161 mg	gesund o. B.	31 200
3 Std nach Behandlg. 168 mg	ohne sichtbare Erscheinungen	31 400
6 Std nach Behandlg. 139 mg	starkes Zittern des gesamten Tieres	33 200
8 Std nach Behandlg. 123 mg	Seitenlage und starke Krämpfe	16 200
18 Std nach Behandlg.	*tot*	—

haltes ein starker Abfall und nach wenigen Stunden der Tod. Oftmals trat die Erhöhung des Blutzuckerspiegels später als in dem angegebenen Beispiel ein, aber der Gesamtverlauf war immer der Gleiche, zeigte jedoch nicht die extremen Werte wie bei Läuger (siehe auch S. 82).

Besprechung der Befunde.

Die einzigen Versuchsergebnisse, die unmittelbar mit unseren Resultaten vergleichbar sind, liegen von Mülhens vor. Von ihm wurden noch 15 mg „Gix" bei Mäusen als wirkungslos angegeben. Da keine genauen Angaben über das Gewicht der verwendeten Mäuse gemacht wurden, liegt die Dosis wohl gerade an der Grenze des Bereiches, der auch von uns als nicht absolut tödlich festgestellt wurde. *Täglich* 0,2 g einer 20%igen Gixemulsion (= 24 mg Wirkstoff) auf der enthaarten Haut verrieben, führte bei Mäusen nach *6—10 Tagen* zum Tode (= 144—240 mg *Gesamt*-wirkstoffmengen). Auch dieser Wert steht nicht im Widerspruch zu der von uns als tödlich wirksam erkannten Menge.

Ein Vergleich unserer Ergebnisse mit den von Riemschneider und Domenjoz angegebenen chemischen Körpern ist nur mit Vorbehalt möglich, weil wir nicht den reinen Wirkstoff besaßen; es besteht die Möglichkeit, daß die Zusätze im „Gix" — Emulgator und mineralische Öle als Lösungsmittel — die toxische Wirkung des reinen Wirkstoffes beim Warmblüter verändern können. Von dieser Einschränkung abgesehen, stimmen unsere Werte (mg/Maus) mit denen von Riemschneider überein (um 400 mg/kg).

Vergleichen wir unsere Befunde darüber hinaus mit den *Chlor*verbindungen (DDT-Gesarol), so kommen wir zu dem gleichen Resultat wie Riemschneider mit seiner Fluorverbindung. Ein wesentlicher Unterschied in den toxischen Eigenschaften zwischen den geprüften Chlor- und unseren Fluorverbindungen besteht nicht. Unterschiede bestehen nur beim Vergleich verschiedener Lösungsmittel und verschiedener Applikationsarten. Mit „Gix" vergleichbar sind dabei nur die in Öl gelösten DDT-Präparate. Die letale Dosis beider chemischer Körper liegt aber in der gleichen Größenordnung, dabei ist zu berücksichtigen, daß die Angaben verschiedener Autoren nicht ganz übereinstimmen.

Das Handelspräparat „Gix" ist danach nicht giftiger als das in Öl gelöste DDT. Die bei der praktischen Anwendung üblichen Konzentrationen dürften jedoch unschädlich sein, wenn sie kurzfristig einwirken.

Mülhens führt die giftige Wirkung des Präparates „Gix" auf seinen Fluorgehalt zurück und zitiert Zanger, der insbesondere organische Fluorverbindungen für äußerst giftig ansieht. Dagegen hält Roholm (Hefters-Handbuch) organische Fluorverbindungen im Vergleich zu den anorganischen für nur wenig toxisch. Man darf aber meines Erachtens die Wirkung des Präparates nicht von einzelnen Teilen des Moleküls ableiten wollen, denn sie geht auf das Gesamtmolekül zurück, ja sogar auf eine bestimmte Struktur — sind doch auch z. B. die verschiedenen Isomere des DDT in ihrer toxischen Wirkung auf den Warmblüter, wie auch in ihrer insektiziden Wirkung völlig verschieden — ja beide Wirkungsarten laufen in keiner Weise parallel zueinander, wie P. Müller (1946) sehr

deutlich zeigen konnte. Auf diese Zusammenhänge wies auch Domenjoz (1946) hin. Es war nämlich vermutet worden, daß auch der Wirkungsmechanismus der DDT-Verbindungen auf bestimmte Gruppen des Moleküls zurückgehe (Läuger). Es ist aber weder der Chlorbenzolrest für die insektizide Wirkung des Moleküls verantwortlich zu machen, noch die Lipoidlöslichkeit von der Trichloräthangruppe abhängig.

Einmaliges oder gelegentliches Arbeiten mit dem Präparat „Gix" wird kaum zu Störungen führen können — wie H. Mülhens von sich und ich von 2 technischen Assistenten und mir selbst ebenfalls berichten kann. Jedoch dürfen Personen, die unter Umständen täglich und lange Zeit hindurch bei der Anwendung des Präparates ohne Schutzmaßnahmen mit ihm in Berührung kommen, zweifellos in gewissem Grade gesundheitlich gefährdet sein.

II. Teil.

Pathologisch-anatomische Untersuchungen.

Pathologisch-anatomische Untersuchungen an Laboratoriumstieren, die mit „Gix" vergiftet wurden, sind nicht bekannt geworden. Jedoch berichtet Buxton (1945) über entsprechende Arbeiten mit DDT (Smith und Stohlmann 1944, Lillie und Smith 1944, sowie Neal, v. Oettingen u. Mitarb. 1944 und Draize, Nelson und Calvery 1944). Weitere histologische Untersuchungen sind uns von Emmel und Krüpe (1945), Cameron (1945), Haymaker, Ginzler und Ferguson (1946), Carey, Downer, Toomey und Haushalter (1946), Fitzhugh und Nelson (1947) bekannt geworden.

Sie stimmen wohl sämtlich darin überein, daß vorwiegend die *Leber* mehr oder weniger starke Schädigungen erkennen läßt. Buxton (1945) berichtet von auffallenden Veränderungen, fokalen Nekrosen oder Zonen von zentrolobulären Nekrosen, die auf den Untergang zahlreicher Leberzellen schließen lassen. Meist ist eine fettige Degeneration festzustellen. Phagozytierende Zellen durchsetzen diese nekrotischen Gebiete und führen gemeinsam mit einer Autolyse zur Beseitigung des abgestorbenen Gewebes. Die Gallengänge werden nicht angegriffen. Wird die kritische Periode verminderter Leberfunktion überlebt, dann kann völlige Regeneration der Leber erfolgen, wenn sekundäre Infektionen ausbleiben. Fibrosis der Leber tritt selten auf, wohl nur bei wiederholter Applikation sehr hoher DDT-Dosen. Überschreiten diese jedoch ein gewisses Maß, so daß die Tiere bereits innerhalb weniger Stunden zugrunde gehen, so sind unter Umständen auch gar keine Veränderungen feststellbar. Emmel und Krüpe (1946) beobachteten bei chronischer Verabreichung unterschwelliger Dosen Schädigungen „in Form von Rundzellenbildungen in der Nähe der Gefäße und fettige Degenerationen". Auch Haymaker, Ginzler und Ferguson (1946) fanden als regelmäßige konstante Veränderung an der Leber fettige Degenerationen der Leberzellen, meist zentrolobulär, aber auch in den mittleren Bereichen der Leberläppchen. Bei längerer chronischer Vergiftung trat auch intralobuläre Atrophie ein. An anderen Organen waren keine bemerkenswerten Veränderungen zu finden. Fitzhugh und Nelson (1946), die Ratten während zweier Jahre mit verschiedenen DDT-Gaben fütterten, fanden in der durch Hypertrophie

der Zellen stark vergrößerten Leber häufig eine Tendenz zur Bildung von Karzinomen. Diese treten aber erst nach etwa 90 Wochen in Erscheinung. Häufig waren fettige Degenerationen aber meist geringen Grades. Das Zytoplasma zeigte eine Tendenz zur Hyalinisierung. Die Stärke der charakteristischen mikroskopischen Veränderungen war proportional der applizierten DDT-Dosis, aber unabhängig von der Art der Anwendung. Nekrotische Bezirke in der Leber beobachteten sie nur bei Ratten. Ratten, die nach Absetzen der chronischen, 12 Wochen dauernden DDT-Fütterung histologisch untersucht wurden, zeigten nach 1—2 Wochen Leberschädigungen, die aber 2—4 Wochen später weit geringer waren. Insgesamt 8—10 Wochen nach dem DDT-Entzug hatte die Leber normales Aussehen.

Diese Untersuchungsergebnisse haben eine wertvolle Ergänzung gefunden in einer Arbeit von Läuger, Pulver und Montigel (1945). Sie führten physiologisch-chemische Untersuchungen an Laboratoriumstieren durch und konnten zeigen, daß schon geringe Wirkstoffmengen eine rasche Mobilisierung des Leberglykogens bei gleichzeitigem Blutzuckeranstieg bewirken. Es erfolgt ein erhöhter Zuckerverbrauch. Bei vermehrter Milchsäureproduktion kommt es zu einem raschen Absinken des Blutzuckergehaltes bis zu hypoglykämischen Werten. Es entwickelt sich gleichzeitig eine kompensierte Azidosis, wobei die Alkalireserve vermindert wird. Ein Ausgleich kann durch Glukoseinfusionen nach Beginn der hypoglykämischen Vergiftungsphase erreicht werden. Ebenso ist eine therapeutische Beeinflussung durch Dauernarkose möglich. Die Autoren schließen aus den äußeren Symptomen der DDT-Vergiftung (motorische Übererregbarkeit, Tremor) auf eine intensive Wirkung auf das zentrale Nervensystem. Die damit einhergehende Mobilisierung des Leberglykogens mit gleichzeitiger Hyperglykämie läßt das sympathische Nervensystem als Angriffspunkt des DDT-Wirkstoffes im Warmblüterorganismus in Betracht ziehen (Läuger, Pulver und Montigel 1945).

Andere Organe sind offenbar weniger betroffen. Manchmal ist die Niere leicht geschädigt; sie sind gegenüber den Kontrollen vergrößert, insbesondere bei *starker Funktion* der Leber. Gelegentlich findet man im Herzmuskel sowie in der Nebennierenrinde veränderte Herde, aber diese Schäden sind unbedeutend (Lillie und Smith 1944). Zudem sind die beobachteten Veränderungen das Ergebnis ständiger Einwirkung von *großen* DDT-Dosen. Im Experiment vertragen Tiere Mengen von DDT in einer Größenordnung, die über der Dosis liegen, denen *der Mensch bei der Insektenbekämpfung ausgesetzt ist*, ohne schädliche Wirkungen zu zeigen.

Erwähnenswert sind die Untersuchungen von Emmel und Krüpe (1946), die bei Mäusen und Meerschweinchen, welche mit 5 mg DDT, in Olivenöl gelöst, oral vergiftet wurden, die Verteilung und Speicherung des Wirkstoffes in verschiedenen Organen an deren insektizider Wirkung prüften. Leber und Nieren zeigten anfänglich einen relativ hohen Wirkstoffgehalt, während Blut und Gehirn geringe Mengen aufwiesen. Später, nach etwa 22 Std, findet ein allgemeiner Ausgleich statt. Alle Organe enthalten fast gleiche Mengen DDT, Blut und Großhirn etwas weniger als andere Organe.

Den relativen DDT-Gehalt des Blutes konnten Emmel und Krüpe mit Hilfe von Wanzen nachweisen, die nach einer Blutmahlzeit zum großen Teil daran zugrunde gingen. An der Höhe der Sterblichkeit der Wanzen, die an einem mit DDT vergifteten Meerschweinchen Blut aufnahmen, konnte die DDT-Konzentration im Blut festgestellt werden. Sie war bei einer oralen Gabe von 160 mg/Tier nach etwa 4 bis 7 Std am größten.

Während Emmel und Krüpe die Prüfung des DDT-Gehaltes der Organe vorwiegend mit Fliegen vornahmen, die über die frisch entnommenen und in dünner Schicht ausgebreiteten Organe des getöteten Tieres laufen mußten, gewann Witt (1947) den Wirkstoffanteil aus getrockneten Organen durch Extraktion mit Azeton,

Tabelle 6. *Toxizitätsuntersuchungen mit DDT an der Maus.*

Autor	Jahr	Lösungsmittel	Art der Applik.	tödliche Einzeldosis mg/Tier	tödliche Einzeldosis g/kg	Dosis min toll g/kg
Domenj.	1944	Gummiarabik. Emulsion	oral	32	1,6	0,5 g/kg
„	1944	Olivenöl	oral	3,5	0,175	
W.N.u.C.	1944	Öl (Corn-oil)	oral	8,96	0,448	
E. u. K.	1946	Olivenöl	oral	1,0	0,05	< 0,05
Domenj.	1944	wäßrige Emulsion	s. c.	20	1,0 —1,5	0,25—0,5
„	1944	Gummiarabik. Emulsion	p. c.	5—10	0,25—0,5	
„	1944	Olivenöl	p. c.	5—10	0,25—0,5	0,075—0,1
E. u. K.	1946	Olivenöl	p. c.		(etwa 0,375)	> 1,52
„	1946	Olivenöl	i. m.			> 1,0—1,25
„	1946	Olivenöl	i. p.			> 0,25—1,0
Buxtorf	1945	ohne Angabe	p. c. oral	5—10 32	0,25—0,5 1,6	

Tabelle 7. *Toxizitätsuntersuchungen mit DDT an der Ratte.*

Autor	Jahr	Lösungsmittel	Art der Applik.	tödliche Einzeldosis mg/Tier	tödliche Einzeldosis g/kg	Dosis min toll g/kg
Domenj.	1944	Gummiarabik. Emulsion	oral	75	0,5	0,25
H. u. L.	1948	Gummiarabik.	oral		> 1,00	
Domenj.	1944	Olivenöl	oral	42	0,28	
W.N.u.C.	1944	Öl (Corn oil)	oral	(25)	0,180	
S. u. St.	1944	Olivenöl	Magen	(20—21)	0,150	
C. u. P.	1945	Paraffin liquid.	Magen	(110)	0,800	
Domenj.	1944	wäßrige Emulsion	s. c.	> 250-300	2,0	1,0—1,5
C. u. P.	1945	Paraffin liquid.	s. c.		1,50	
Buxtorf	1945	ohne Angabe	i. p.		0,1	< 0,1
H. u. L.	1948	Gummiarabik.	i. p. p. c.		0,2 1,0	
Domenj.	1944	Gummiarabik. Emulsion	p. c.	200	1,000	
„	1944	Olivenöl	p. c.	50—75	0,25—0,5 (etwa 0,45)	0,10—0,150
C. u. P.	1945	Äther, Kerosene Phthalate	Haut		3,0	

Domenj. = Domenjoz — E. u. K. = Emmel und Krüpe
W.N.u.C. = Woodard, Nelson u. Calvery — S. u. St. = Smith u. Stohlmann
C. u. P. = Cameron u. Burgess — H. u. L. = Hoffmann u. Lendle

dampfte ein und löste den trockenen Rückstand in 1 cm³ absolutem Alkohol; je 0,02 cm³ wurden Fliegen dorsal aufgetropft. Im Gegensatz zu den Organen normaler Tiere war der Extrakt von DDT-vergifteten Tieren hoch insektizid. Auffallend war, daß das Gehirn wiederum den geringsten Wirkstoffgehalt zeigte. Andererseits zeigte kein anderes Organ (Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, Muskulatur) eine nennenswerte selektive Speicherung.

Im Zusammenhang mit den Vergiftungserscheinungen nach DDT- und Gix-Gaben war die Frage der *nachweisbaren Schädigungen* des Zentralnervensystems durch DDT von besonderem Interesse. Diese werden von Buxton als unbeträchtlich angegeben. Er beschreibt Vakuolisation in der Umgebung der großen Nervenzellen im Rückenmark und „cerebral motor nuclei". Lillie und Smith betonen ausdrücklich, daß im Hinblick auf die ausgesprochenen neurologischen Symptome bei einer DDT-Vergiftung die histologischen Veränderungen relativ gering seien. Haymaker, Ginzler und Ferguson, die ihre Untersuchungen besonders auf die Schädigung im Gehirn abgestellt hatten, nahmen neben der histologischen Untersuchung auch enzephalographische Studien an Hunden vor. Es erscheint danach, daß die DDT-Wirkung vorwiegend am Cerebellum ansetzt. Zu gleichen Schlüssen führte sie die pathologisch-histologische Untersuchung. In anderen Teilen des Zentralnervensystems fehlten histologische Veränderungen. Im einzelnen bestanden die histologischen Veränderungen in pyknotischen oder schlecht färbbaren Purkinjeschen Zellen („ghosts"); einige waren geschwunden. Gegenüber Kontrollen waren die Nervenzellen etwas zahlreicher, viele zeigten Chromatolyse und vakuolisiertes Zytoplasma, Karyorhexis oder völligen Verlust des Zellkerns. Einige Zellen waren völlig gestaltlos.

Carey, Downer, Toomey und Haushalter konnten darüber hinaus erhebliche morphologische Veränderungen am neuromuskulären Apparat der quergestreiften Muskulatur des Chamäleons und der Ratte nachweisen. Nach einer Gabe schnell tötender DDT-Emulsionen (1% DDT in 8% Olivenöl + 1% Gummiarabikum + 90% Locke-Lösung; 2 cm³ i. p. in Ratten von 250 g und 0,1 cm³ in Chamäleons [Anolis caroliniensis] von 3—8 g injiziert) wurden der Musculus gastrocnemius, Nervus ischiaticus und das Rückenmark mikroskopisch untersucht. Die Ratten starben 12—72 Std, die Chamäleons 6—24 Std nach der Gabe.

Die auffallendsten mikroskopischen Befunde an 0,5—15% der motorischen Innervation der Gastrocnemius waren u. a.: 1. progressives Schwinden der auriphilen Substanz bei einigen epilemmalen Axonen und Demyelinisation einiger peripherer Nerven, 2. zentrifugale Verlagerung dieser auriphilen Substanzen von der motorischen Endplatte in das Myoplasma entweder als längliche Streifen oder Perlschnur-artig oder als länglich orientierte Masse, 3. Subsarcolemmale Lage zusammengeballter Inseln vermehrter auriphiler Substanz, die man in Muskelfaserquerschnitten findet, 4. akute Atrophie in Muskelfasern, die von DDT getroffen wurden, 5. Schwinden der motorischen Endplatten in 10—30% der untersuchten Gastrocnemius-Muskeln gegen Ende der DDT-Paralyse.

Diese zum Teil erheblichen morphologischen Veränderungen am neuromuskulären Apparat sind besonders bedeutsam, weil sie infolge der kurzfristigen Einwirkungsdauer auf eine direkte DDT-Wirkung schließen lassen.

Eigene pathologisch-anatomische und histologische Befunde.

a) *Sektionsbefunde.*

Die Zerlegung der Versuchstiere ergibt sinnfällige Veränderungen an einigen Organen, und zwar Schwellung sowie Blutreichtum der Milz und der Leber; die Lungen sind wenig kollabiert, erscheinen gebläht und lassen unter ihrem Überzug feinste Blutpunkte erkennen. — Das Zentralnervensystem weist zwar deutliche Gefäßzeichnung auf und hat einen höheren Feuchtigkeitsgehalt, läßt aber makroskopisch keine Besonderheiten erkennen.

b) *Pathologisch-histologische Befunde.*

1. Zentralnervensystem.

Die Beurteilung der Veränderungen am Zentralnervensystem der Maus erfolgt vorsichtig, weil die technische Bearbeitung dieses winzigen Organs selbst bei ausreichender Sachkenntnis leicht zu Fehlergebnissen führen kann.

Die histopathologischen Veränderungen sind ziemlich einheitlicher Natur und pflegen — von Ausnahmen abgesehen — regelmäßig nachweisbar zu sein. Die Reaktionen am mesenchymalen Gefäßapparat geben sich neben einer auffallenden Blutfülle in fast allen Gefäßabschnitten als Schädigungen einzelner Gefäßbahnen (vorwiegend Venen) zu erkennen: Außer nekrobiotischen Wandabschnitten und Loslösung von Wandzellen sind Blutaustritte in Form sogenannter *Mantel*blutungen (keine Purpura) erkennbar. Nur selten wird eine partielle Ventrikeltamponade (III. Ventrikel) beobachtet. Auch Leukostasen und Kernschwellung der Kapillarwandungen finden sich. Im Gegensatz zu den Veränderungen am ektodermalen Gewebe (siehe unten) ist eine bestimmte Pathoklise am mesenchymalen Gewebe nicht nachweisbar. Vaskuläre lymphozytäre Infiltrate scheinen nicht zum typischen Bild zu gehören, werden aber gleichwohl gelegentlich festgestellt (normales, nicht differenziertes embryonales Keimmaterial? Ventrikelnähe!)

Die Veränderungen an den Zellelementen ektodermalen Ursprungs sind regelmäßiger und betreffen besonders die *Ganglienzellen*. Es werden Kern- und Plasmaschäden nachgewiesen. Die Kernveränderungen sind oft nur schwach als Pyknose zu erkennen. Karyorhektische Figuren finden sich häufiger, sie sind in der Regel nicht diffus verteilt, sondern lokalisiert. Im Stirnpol erscheinen die Kerne der Ganglienzellen gruppenweise ergriffen, indem sie zunächst mehr randständiges Chromatin und später Verdichtungen, Verklumpungen und Bildung von Chromatinbröckeln zeigen. Im Stirnpol sind solche Bilder vorherrschend, wenn auch keineswegs regelmäßig. Im Kleinhirn dagegen findet sich häufig teilweiser oder vollständiger Kernschwund der Purkinjeschen Zellen, auch

verwaschene Zytoplasmafärbung dieser Zellen wird beobachtet. Gelegentlich schwinden die Purkinjezellen sogar gänzlich. Die Basalganglien sowie die Rinde, das Ammonshorn und Rückenmark sind weniger häufig ergriffen. Während echte gliöse Neuronophagie (seltener beobachtet) etwa 70 Std nach der „Gix"-Wirkung zu verzeichnen ist, werden Zellplasmaschäden (in der Hauptsache Homogenisierung, Vakuolenbildung) früher festgestellt.

Mehrmalige orale Gaben führen 7—12 Tage nach der Aufnahme zur Bildung von Stäbchenzellen in Streifenkörper, Ammonshorn, Thalamus und Rückenmark. Daneben sind regressive Veränderungen in Glia- und Ganglienzellen zu finden.

Nach obigen Darlegungen läßt das pathologisch-histologische Bild, besonders was die ektodermalen Bestandteile anbetrifft, zwar keine absolut sichere Pathoklise erkennen, doch fällt häufig die Bevorzugung des Stirnpols und des Kleinhirns auf.* Ähnliche Ergebnisse liegen nach Haymaker, Ginzler und Ferguson (1946) für die DDT-Wirkung vor.

Als wesentlich haben die Karyorhexis und Chromatolyse zu gelten, während die anderen Veränderungen in zweiter Linie zu nennen sind. Nach den Untersuchungen besitzt *„Gix" Eigenschaften, eine Erkrankung des Zentralnervensystems mit histologisch nachweisbaren Reaktionen hervorzurufen.* Die Veränderungen sind in der Hauptsache degenerativer Art.

2. Lunge.

Das Lungengewebe läßt in der Regel tiefgreifende Veränderungen, seltener nur unbedeutende Plasmaergüsse in die Alveolen ohne Erythrozytenbeimengungen erkennen. Häufig kommt es nach anfänglich praller Füllung der interalveolären Kapillarnetze zum Austritt geformter Blutbestandteile, die große Teile der luftgefüllten Abschnitte vollständig ausfüllen können. In den Alveolarräumen treten Rundzellen und Makrophagen auf. Sowohl die Aufzweigungen der Bronchialäste als auch die Gefäßlumina zeigen sich unter Umständen auffallend gedehnt. Hierbei entwickelt sich nebenher ein vikariierendes Emphysem.

3. Leber.

Fast regelmäßig zeigt das Parenchym Veränderungen in Form von Kern- und Plasmaschäden. Die Kernveränderungen bestehen entweder in Vergrößerung oder Verkleinerung der Zellkerne oder in Kernfragmentation sowie Chromatolyse. Das Zytoplasma erscheint stellenweise vakuolenhaltig, homogenisiert oder ist nicht mehr tingierbar. Außer

* Man geht wohl nicht in der Annahme fehl, dies mit den Gesetzmäßigkeiten des zerebralen Stoffaustausches im Sinne von Roeder in Zusammenhang zu bringen (siehe Roeder, F.: Der Phosphataustausch des Nervensystems, untersucht mit Hilfe der Isotopenmethode. Verlag „Muster-Schmidt", Göttingen 1948, ref. in Dtsch. Tierärztl. Wschr. **1948**, 310).

starker Erweiterung besonders der venösen Blutbahnen finden sich auch kleinste Blutextravasate.

4. Milz.

Kernfragmentationen der Pulpazellen treten häufig auf, jedoch keineswegs regelmäßig. Oft ist nur ein stärkerer Blutgehalt sichtbar. Während in einem Fall eine erhebliche hyaline Verquellung und Verbreiterung des Stützgewebes vorhanden ist, zeigt ein weiterer Fall einen submiliaren nekrobiotischen Herd mit Erythrodiapedese. Es bleibt unter Beachtung der Kontrollversuche unentschieden, ob in den Veränderungen dieser beiden Fälle tatsächlich eine „Gix"-Wirkung zu erblicken ist.

5. Niere.

Neben Nephroseerscheinungen in den Tubulusabschnitten der Rinde treten Schrumpfungen der Malpighischen Körperchen hervor, während Blutextravasate in den Hintergrund treten. Solche Veränderungen pflegen jedoch erst nach mehrmaligen „Gix"-Gaben und nach Ablauf von etwa 6 Tagen nachweisbar zu sein. Nach 12 Tagen können histologisch Übergänge zur subakuten Glomerulonephritis bestehen.

6. Herz.

Im Herzmuskel sind hier und da feinste Blutaustritte sichtbar. Die Muskelkerne zeigen verschiedentlich Pyknose und lassen eine Neigung zu Splitterbildung erkennen. Mehrfach finden sich im Stützgewebe kleinere Rundzellenansammlungen. Ihre Entstehung scheint nicht „Gix"-spezifisch zu sein, zumal sie nach den Versuchen innerhalb von 40 Std entstehen müßten.

Aus den zellulären Gewebsreaktionen muß geschlossen werden, daß *„Gix" als neuro- wie auch organotroper Wirkstoff zu bezeichnen ist.*

Besprechung der Befunde.

Im Gegensatz zu den toxikologischen Untersuchungen fehlen pathologisch-anatomische Untersuchungen über die Wirkung von „Gix" auf die Organe. Daher bleibt nur ein Vergleich mit den eingangs zitierten Befunden an DDT-vergifteten Tieren.

Buxton (1946) faßt seine Betrachtungen über die pathologisch-anatomischen Veränderungen durch DDT-Vergiftungen dahingehend zusammen, daß trockener oder wäßrig suspendierter Wirkstoff keine Gefahr erwarten läßt, wenn er auf die Haut gebracht oder oral aufgenommen wird. Diese Darstellung stimmt jedoch nicht mehr für intraperitoneale Gaben. In Öl gelöst, wird DDT durch die Haut sowie vom Darmtraktus aus gut resorbiert und führt zu erheblichen Schädigungen der Organe, vorwiegend der Leber. Außerdem sind, wie oben dargelegt, auch an dem Zentralnervensystem und am neuromuskulären Apparat morphologisch

nachweisbare Schädigungen festzustellen. Es ist zwar richtig, daß die bei der Insektenbekämpfung üblichen Konzentrationen in den meisten Fällen keine Schädigungen des Warmblüters mit sich bringen. Es ist aber übertrieben, bei „Gix" und den verwandten DDT-Verbindungen von einer völligen Harmlosigkeit dieser Präparate zu sprechen. Es muß bei ständigem Arbeiten mit diesen Präparaten mit einer Kumulation gerechnet werden, die je nach der Empfindlichkeit der Personen zu Schädigungen führen kann. Diese erstrecken sich vorwiegend auf die Leber, aber auch die Niere kann nach längerer Einwirkungsdauer angegriffen werden. In Übereinstimmung mit der DDT-Wirkung wird ohne Zweifel das Zentralnervensystem direkt geschädigt, wie die schon nach kurzer Zeit zu beobachtenden Zellkernveränderungen erkennen lassen. Die bei der DDT-Wirkung festgestellten Veränderungen an den Nervenbahnen haben wir nicht prüfen können.

Unser Interesse an den pathologisch-anatomischen Veränderungen bezog sich vorwiegend auf die Frage, wie weit uns die Zellreaktionen Aufschluß über die Wirkungsweise der sogenannten Kontaktinsektizide vermitteln können. Es ist aber im einzelnen schwer zu entscheiden, welche Organschädigungen primär, welche sekundärer Natur sind. Da die pathologischen Befunde an Leber und Gehirn bereits nach einigen Stunden und wenigen Tagen auftreten, dürfte es berechtigt sein, diese Orte als primären Angriffsort zu betrachten. Dafür sprechen auch die Blutzuckerwerte.

Hoffmann und Lendle versuchten, den Wirkungsmechanismus des DDT mit pharmakologischen Methoden zu klären. Sie kamen dabei jedoch auch noch nicht zu einer eindeutigen Entscheidung. Sicher kommt den DDT-Präparaten keine Spezifität gegenüber den Insekten zu. Insekten, Kaltblüter, wie Warmblüter unterliegen den gleichen Beziehungen zwischen Körpergewicht und DDT-Dosis. Die Hypothese einer Nervenwanderung konnte an Fröschen nicht bestätigt werden. Heubner (1949) berichtet dagegen über experimentelle Erfahrungen an Stabheuschrecken, die für einen Transport des DDT vornehmlich auf dem Wege der Nervenbahnen sprechen. „Vielleicht liegt das Geheimnis der ‚Spezifität' des DDT in der Besonderheit der mikrochemischen Natur der Insektennerven." Die Versuche zur Aufklärung über die Verankerung der DDT-Wirkung an bestimmte chemische Stoffe oder über ihre Hemmung von Fermentsystemen bei Wirbeltieren brachten noch kein positives Ergebnis, gewinnen aber vielleicht durch die Untersuchungen von Läuger, Pulver und Montigel über den Glykogenstoffwechsel eine gewisse Stütze. Hoffmann und Lendle halten es aber auch für möglich, daß das DDT vielleicht gar nicht im Sinne einer chemischen Fixierung, sondern vielleicht durch Blockierung von Membranen und Strukturen auf Grund einer besonderen Verteilung oder Adsorptionsverdrängung wirksam wird.

Zusammenfassung.

1. Es wurde das kontaktinsektizide Handelspräparat „Gix", das zur sogenannten Gesarol-Gruppe gehört, in seiner Wirkung auf Ratten und Mäuse toxikologisch und pathologisch-anatomisch untersucht. Es unterscheidet sich in seiner chemischen Zusammensetzung durch den Ersatz einiger Chloratome (des DDT) durch Fluor (DFDT). Die genaue chemische Formel wurde bisher nicht publiziert.

2. Die einmalige orale letale Dosis/50% für Mäuse- und Ratten wurde mit 480 mg/kg ermittelt.

3. Als Dosis min. eff. 50% darf eine einmalige Gabe von 216 mg/kg angesehen werden.

4. Täglich gegeben wirken bereits Mengen von 72 mg/kg tödlich (Dos. let. 50%).

5. Aus dem erheblichen Unterschied zwischen den unter 2 und 4 genannten Werten ergibt sich eine Kumulation des Wirkstoffes und damit eine erhöhte toxische Wirkung bei täglichen Gaben.

6. Die erhebliche toxische Wirkung des unverdünnten Präparates „Gix" auf Ratten und Mäuse läßt seine Verwertbarkeit als Mäuse- und Rattengift in Erwägung ziehen.

7. Bei intraperitonealer Applikation liegt die Dosis letalis/50% bei 378 mg/kg.

8. Bringt man unverdünntes „Gix" mit 44—72 mg Wirkstoffgehalt auf die rasierte Rückenhaut einer Maus, so geht diese innerhalb von 21—44 Std unter charakteristischen Erscheinungen zugrunde. Ratten sterben, wenn man „Gix" mit 72 mg Wirkstoffgehalt auf die von Milben befallenen skarifizierten Ohren bringt.

9. Die pathologisch-anatomische und -histologische Untersuchung zeigte deutliche Veränderungen an Milz, Leber, Lungen und Zentralnervensystem.

10. „Gix" besitzt Eigenschaften, eine Erkrankung des Zentralnervensystems mit histologisch nachweisbaren Reaktionen vorwiegend degenerativer Art hervorzurufen.

11. Starke Veränderungen zeigt vor allem die Leber in Form von Kern- und Plasmaschäden, geringere und diese meist erst nach längerer Anwendungsdauer die Niere (bis zur Glomerulonephritis).

12. Ein Vergleich der Gixwirkung mit den beobachteten Schädigungen nach DDT-Wirkung führt zu weitgehenden Übereinstimmungen zwischen beiden Verbindungen.

Literatur.

Buxton, P. A.: Transact. roy. soc. trop. med. and hyg. **38**, 367 (1945). — Buxtorf, A.: Schweiz. Arch. Tierheilkd. **87**, 511 (1945). — Cameron, G. R.: Brit. med. Bull. **3**, 783 (1945). — Cameron, G. R., u. Burgess, F.: Brit. med. J. **1**, 865 (1945). — Carey, E. J., E. M. Downer, F. B. Toomey, u. E. Haushalter: Proc. Soc. exper. Biol. u. Med. **62**, 76 (1946). — Domenjoz, R.: Schweiz. med. Wschr. **74**, 952 (1944). — Arch. internat. pharmacodyn. **73**, 128 (1946). — Draize, J. H., A. A. Nelson, u. H. O. Calvery: J. Pharmakol. **82**, 159 (1944). — Emmel, L., u. M. Krüpe: Z. Naturforschung **1**, 691 (1946). — Fitzhugh, O. G., u. A. A. Nelson: J. Pharmakol. and exper. Therapie **89**, 18 (1947). — Fulton, J. F., u. R. S. Dow: Yale J. Biol. and Med. **10**, 89 (1937). — Haymaker, W., A. M. Ginzler, u. R. L. Ferguson: Am. J. Med. Sci. N. S. **1946**, 212. — Heubner, w. Sitzgsber. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin; Math.-naturw. Kl. Jahrgang 1948; ersch. 1949 Berlin. — Hoffmann, J., u. L. Lendle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 223 (1948). — Gavaudan, P. u. H. Poussel: C. R. Séanc. Acad. Sci. **224**, 683—85 (1947). — Läuger, P., H. Martin, u. P. Müller: Helv. Chim. Acta. **27**, 892 (1944). — Läuger, P., R. Pulver, u. C. Montigel: Helv. Physiol. u. Pharmak. **3**, 405 (1945). — Lewis, W. H., u. A. G. Richards: Science **102**, 330 (1945). — Lillie, R. D., u. M. J. Smith: Publ. Health. Rep. **59**, 979 (1944). — Mayer, K., u. K. Strenzke: Anz. f. Schädlingsk. **1948**, 73. — Mooser, H.: Schweiz. med. Wschr. **74**, 947 (1944). — Mülhens: Dtsch. med. Wschr. **1946**, 164. — Müller, P.: Helv. Chim. Acta **29**, 1560 (1946). — Neal, P. A., W. F. van Öttingen, W. W. Smith, u. a.: Publ. Health. Rep. Wash. Suppl. **183** (1945). — Rademaker, G. G.: I. Das Stehen. Berlin: Springer 1931. — Riemschneider, R.: Zur Kenntnis der Kontaktinsektizide. 2. Beiheft 1. Ergänzungsband. 1947 (Die Pharmazie). — Roeder, F.: Der Phosphoraustausch des Nervensystems, untersucht mit Hilfe der Isotopenmethode. Göttingen: Verlag „Muster-Schmidt" 1948. Ref. Tierärztl. Wschr. **1948**, 310. — Roholm: In Heffters Handbücher. — Schneider, F.: Schweiz. Zschr. Obst u. Weinbau **53**, 22 (1944). — Smith, M. J., u. E. F. Stohlmann: Publ. Health. Rep. **59**, 984—993 (1944). — Velbinger, H. H.: Die Pharmazie 2. Jahrgang **1947**, 268—274. — Wiesmann, R.: Schweiz. Zschr. Obst- u. Weinbau **52**, (1943). — Witt, P. N.: Z. Naturf. 2b, 361 (1947). — Woodard, G., A. A. Nelson, u. H. O. Calvery: J. Pharmacol. **82**, 152 (1944).

Professor Dr. Gerhard Piekarski, Bonn, Reuterstr. 2b.

Nachtrag.

Während der Drucklegung der Arbeit publizierte Joh. Kwoczek (Med. Mschr. 1950, 25) Erfahrungen mit „Gix" und anderen Insekticiden, auf die besonders hingewiesen sei. Unverdünntes „Gix", besonders „Gix"-Destillat, erwiesen sich als recht giftig, so daß vor Überdosierung und irrtümlichem Genuß, sowie unüberlegter Anwendung gewarnt wird. Ein Mann, der zur Entwicklung insekticider Dämpfe unverdünntes „Gix" auf eine stark erhitzte Kochplatte schüttete, erkrankte schwer, erholte sich jedoch nach mehreren Tagen wieder.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 91—97 (1950).

Aus dem Chemisch-physiologischen und dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt.

Über die Beziehungen des Darmstoffs zur Substanz „P" II.

Von

HERBERT FISCHER und WALTHER VOGT.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 17. August 1949.)

In der vorangehenden Arbeit[1] wurde gezeigt, daß die biologischen Wirkungen der Subst. P und des Darmstoffs zum Teil für die Identität, zum Teil aber auch für eine Verschiedenheit der beiden Stoffe sprachen. Weiter wurde gefunden, daß die Blutdruckwirkung der Subst. P in keinem konstanten Verhältnis zur Darmwirkung steht. Da es sich vor allem beim Darmstoff, aber auch bei der Subst. P um sehr geringe, stark wirksame Substanzmengen handelt, schien uns die Papierchromatographie geeignet, weitere Aufklärung über die Beziehungen zwischen beiden Stoffen zu geben.

1. Darmstoffchromatogramme.

In Vorversuchen fanden wir, daß sich der Darmstoff aus Wasser gut mit höheren Alkoholen ausschütteln läßt (versucht mit norm.-, iso-, sec.-Butanol; norm. prim.-, Gärungs-Amylalkohol). Zwischen gleichen Volumina Wasser und Butanol verteilte sich der Darmstoff etwa im Verhältnis 1 : 5.

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Chromatogramme wurden mit sec.-Butanol aufsteigend entwickelt. Die Darmstofflösungen wurden in 10 mm^3-Tropfen 5 cm über dem unteren Rand eines rechteckigen Filtrierpapiers* aufgegeben und das Papier mit dem unteren Rand etwa 1 cm tief in eine Schale mit sec.-Butanol senkrecht eingehängt. Das Lösungsmittel stieg je nach Papiersorte in 18—36 Std 20—30 cm hoch. Danach wurden die Chromatogramme getrocknet und in mehrere Fraktionen zerschnitten. Bei der Einteilung gingen wir willkürlich vor, oder wir richteten uns nach den Grenzen solcher Stoffe, die durch Fluoreszenz oder positive Ninhydrinreaktion sichtbar wurden. Derartige Begleitsubstanzen kamen fast immer vor. Die einzelnen Papierfraktionen wurden mit butanolhaltigem Wasser eluiert, die Eluate auf dem Wasserbad eingedampft und nach Auflösen in jeweils dem gleichen Volumen Wasser oder Ringer-

* Verwendet wurde Filtrierpapier Nr. 589[2], Nr. 598 und Nr. 08158 von Schleicher und Schüll.

lösung am Froschrektum auf ihre Wirksamkeit geprüft. Bei allen Chromatogrammen fand sich die darmerregende Wirkung ausschließlich im obersten Zehntel. Auch am virginellen Meerschweinchenuterus zeigte nur diese Fraktion die charakteristische Darmstoffwirkung[2]. Dem Darmstoff kommt also ein RF-Wert von 0,9—1 zu. (Der RF-Wert bezeichnet die relative Wanderstrecke der untersuchten Substanz, wobei die Gesamtstrecke vom Startpunkt der Substanz bis zur oberen Lösungsmittelgrenze gleich 1 gesetzt ist.) Dadurch läßt sich der Darmstoff auch papierchromatographisch von Histamin (RF der Base in sec-Butanol 0,5; des Dichlorhydrats 0,2) und von Azetylcholin (Chlorid RF 0,3) unterscheiden und trennen. Eine positive Ninhydrinreaktion erhielten wir in der Darmstoffzone der Chromatogramme nie. Ob der Stoff fluoresziert, ist schwer zu entscheiden, da die obere Chromatogrammgrenze immer blaue Fluoreszenz, von Papier- oder Lösungsmittelverunreinigungen herrührend, aufwies. Wir möchten eine Fluoreszenz eher verneinen.

2. Chromatogramme der Substanz P.

Die Entwicklung, Elution und Testung der Substanz-P-Chromatogramme erfolgte in der gleichen Weise wie beim Darmstoff. Die biologische Auswertung der einzelnen Fraktionen ergab folgendes Bild:

In der Zone RF 0—0,3 fanden wir die blutdrucksenkende sowie einen Teil der darmerregenden Wirkung. In diesem Bereich saß auch die Hauptmasse der Subst. P (gewichtsmäßig). Außerdem wirkten aber auch die Zonen RF 0,8—1 erregend auf das Froschrektum, ohne entsprechende Blutdruckwirkung zu zeigen. In den mittleren Zonen war — bei den einzelnen Chromatogrammen wechselnd — ebenfalls mehr oder weniger Darmwirkung vorhanden. Während also die blutdrucksenkende Eigenschaft auf das untere Chromatogrammdrittel beschränkt blieb, verteilte sich die darmerregende über das ganze Chromatogramm, manchmal ziemlich gleichmäßig, meist aber mit einem Maximum bei RF 0—0,3 und einem zweiten bei 0,8—1. Das konnte zweierlei bedeuten. Entweder bestand die Subst. P aus *einem* Stoff, der den Blutdruck senkt und den Darm erregt, und der einen RF-Wert von 0—0,3 besaß. Diese Substanz mußte dann mit einem 2. Stoff, der wie der Darmstoff einen hohen RF-Wert und keine oder relativ schwache Blutdruckwirksamkeit hatte, verunreinigt sein. Die andere Möglichkeit war die, daß die Darmwirksamkeit aller Zonen auf dem gleichen, von dem blutdrucksenkenden Faktor verschiedenen, aber mit dem Darmstoff verwandten Stoff beruhte. Von diesem darmerregenden Faktor war dann anzunehmen, daß er infolge von Adsorption an Begleitsubstanzen oder auf Grund von Veränderungen des Verteilungskoeffizienten durch solche Begleitsubstanzen erschwert und verzögert im Chromatogramm nach oben wanderte und sich deshalb über das ganze Chromatogramm verteilte.

Daß solche Löslichkeitsveränderungen bei der Subst. P eine Rolle spielen, wurde uns dadurch deutlich, daß bei der Verteilung von Subst. P zwischen gleichen Volumina butanolgesättigtem Wasser und wassergesättigtem Butanol die Grenzfläche der beiden Phasen nach oben verschoben wird; d. h. die relative Löslichkeit von Butanol in Wasser hat sich auf Kosten der umgekehrten Löslichkeit erhöht. Die Möglichkeit adsorptiver Bindung an Bestandteile der Subst. P wird daraus ersichtlich, daß es uns nicht gelang, zu einer Subst.-P-Lösung zugefügten Darmstoff aus dem Trockenrückstand der Lösung mit Chloroform wieder zu extrahieren, obwohl der Darmstoff sonst mit diesem Lösungsmittel gut extrahierbar ist.

Zur weiteren Klärung gingen wir nun folgendermaßen vor: Von dem in der vorangehenden Arbeit[1] bereits erwähnten Eulerschen Präparat P wurde ein Chromatogramm* entwickelt, dieses kurz oberhalb des gelb

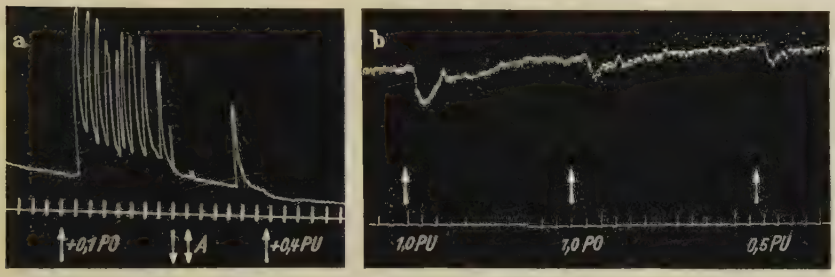


Abb. 1. Vergleich der unteren Fraktion (P_u) des fortgesetzten P-Chromatogramms gegen die obere (P_o). a) Ausgewaschenes Froschrektum. Vor Beginn des Kurvenabschnitts Atropin 1 : 2 Mill. ↓ = Spülen. ↑ A = Spülen und Hinzufügen von Atropin, Endkonzentration 1 : 2 Mill. Zeit 1 min. b) Kaninchenblutdruck. Atropin 2 mg/kg. Zeit 10 sec.

erscheinenden Randes der Hauptmasse der Substanz bei RF 0,4 zerschnitten und die beiden Fraktionen getrennt eluiert. Die aus dem unteren Eluat gewonnene Substanz wurde erneut chromatographiert, das davon erhaltene Chromatogramm wieder in der gleichen Weise zerlegt, wiederum das untere Drittel neu chromatographiert und so fort, bis 4 Chromatogramme durchlaufen waren. In jeder der 4 oberen Phasen (RF 0,4—1) fanden wir Darmwirksamkeit, aber auch das letzte untere Eluat wirkte noch erregend auf das Froschrektum. Die 4 oberen Eluate wurden nun gesammelt und auf das gleiche Volumen gebracht ($= P_o$) wie das untere Eluat ($= P_u$). Der Vergleich am Froschrektum zeigte, daß P_o etwa 5mal so wirksam war wie P_u (Abb. 1a). Umgekehrt hatte P_u am Kaninchenblutdruck eine doppelt so starke Wirkung wie P_o (Abb. 1b). Auf gleiche Blutdruckwirksamkeit bezogen, war P_o also 10mal so stark darmwirksam. Die blutdrucksenkende und die darmerregende Wirkung der Subst. P beruhen demnach auf 2 verschiedenen Stoffen, von denen der

* Um genügend Material für die biologische Prüfung zu gewinnen, fertigten wir mehrere gleichzeitig nebeneinander laufende Chromatogramme an; die einander entsprechenden Eluate wurden wieder zusammengegeben.

eine, im wesentlichen darmerregende, wie der Darmstoff im Chromatogramm nach oben läuft, während der andere im unteren Drittel bleibt. Nur ist die Wanderung des darmwirksamen Faktors — wahrscheinlich aus den oben erläuterten Gründen — erschwert und daher bei einmaliger Chromatographie unvollkommen. Wieweit der eine Faktor auch die Wirkung des anderen — in geringerem Maße — hat, geht aus diesem Versuch nicht hervor, da die Trennung sicher nicht vollständig gelang, sondern jeder Faktor noch mit dem anderen verunreinigt war.

3. Trypsinverdauung.

v. Euler zeigte 1936[3], daß Subst. P nach Behandlung mit Trypsin sowohl die darmerregende als auch die blutdrucksenkende Wirkung verlor. In einem früher orientierungshalber unternommenen Verdauungsversuch fanden wir, daß Darmstoff und Subst. P nach 24stündiger Behandlung mit Trypsin am Froschrektum unverändert wirkten. Da der damalige Ansatz in nicht gepufferter Lösung und mit einem Trypsinpräparat unbekannter Herkunft durchgeführt worden war, maßen wir dem Befund keine besondere Bedeutung bei und verzichteten auf die Prüfung am Blutdruck. Nachdem nun durch die Papierchromatographie nachgewiesen war, daß die Substanz P kein einheitlicher Wirkstoff ist, griffen wir die Trypsinversuche erneut auf. Beim Studium der in der v. Eulerschen Arbeit[3] abgedruckten Kurven (Abb. 6 der Arbeit) hatten wir den Eindruck, daß das trypsinbehandelte Präparat P am Kaninchenblutdruck zwar unwirksam war, daß aber am Kaninchendarm die Erregung nicht so eindeutig fehlte. Hier wurde das Bild durch die Eigenwirkung des Trypsins kompliziert. Eigene Versuche am Froschrektum bestätigten die Ergebnisse v. Eulers[3] und Rocha e Silvas[4], daß Trypsin darmerregend wirkt. Weiter zeigte sich aber, daß nach Trypsinerregung das Froschrektum nicht mehr deutlich erkennbar auf Darmstoff ansprach. Es war daher für die exakte biologische Testung von trypsinhaltigen Darmstoff- oder P-Präparaten notwendig, die störende Fermentwirkung auszuschalten. Dies wurde durch Inaktivierung des Trypsins (10 min Kochen) erreicht, wodurch der Darmstoff und die Substanz P nicht geschädigt werden. Das so inaktivierte Trypsin hatte in den in Frage kommenden Mengen weder Eigenwirkung noch beeinflußte es die Darmstoffwirkung.

Für die Verdauungsversuche wurden Subst. P (Präparat P_{10} aus Pferdedarm) und Darmstoff (Präparat E_{14}) in Bikarbonat-Phosphatpuffer gelöst. Die Pufferlösung enthielt die gleichen Konzentrationen der beiden Salze, in denen diese in Tyrode enthalten sind. Das p_H betrug 7,5. Als Ferment benutzten wir ein nach dem Verfahren von Northrop[5] hergestelltes Trypsinpräparat von hoher Aktivität, das in 0,12%iger Lösung als aktives oder, 10 min gekocht, als inaktives Ferment zugesetzt wurde.

Ansätze:

1. 4 cm³ E_{14} (etwa 0,3 mg Substanz) +0,1 cm³ Trypsinlösung (= 1,2 mg Trypsin) = E_{14}Tr.
2. 4 cm³ E_{14} + 0,1 cm³ Trypsinlösung inaktiviert = E_{14}Tr. In.
3. 4 cm³ E_{14} allein = E_{14}.
4. 4 cm³ P_{10} (80 mg Substanz) + 0,1 cm³ Trypsinlösung = P_{10}Tr.
5. 4 cm³ P_{10} + 0,1 cm³ Trypsinlösung inaktiviert = P_{10}Tr. In.
6. 4 cm³ P_{10} allein = P_{10}.
7. 4 cm³ Pufferlösung + 0,1 cm³ Trypsinlösung = Tr.

Alle Ansätze wurden in Ampullen eingeschmolzen, 22 Std bei 38° gehalten, dann im Wasserbad erhitzt und 10 min darin gekocht. Zur Vermeidung von Eigenwirkungen der Pufferlösungen wurde das zur biologischen Prüfung verwendete Froschrektum in einem Bad suspendiert, das Bikarbonat und Phosphat in der gleichen Konzentration enthielt, wie die Verdauungsansätze. Die Badelösung entsprach also froschisotonischer Tyrode ohne Traubenzucker und $MgCl_2$. Es zeigte sich, daß weder die Subst. P noch der Darmstoff, am Froschrektum und am Kaninchendünndarm (in Tyrode) getestet, durch die Trypsinbehandlung an Wirksamkeit eingebüßt hatten. Am Kaninchenblutdruck dagegen hatte das mit Trypsin angesetzte P-Präparat weniger als ein Fünftel der Wirkung der unbehandelten oder mit inaktiviertem Trypsin angesetzten Kontrollen (Abb. 2). Unter der Fermenteinwirkung war also ein Stoff zerstört worden, der über 80% der blutdrucksenkenden Wirkung von P_{10} verursacht hatte, dem aber keine Darmwirksamkeit zukam. Die Blutdruckwirkung der trypsinbehandelten Darmstofflösung war gegenüber der Kontrolle gleichgeblieben.

Aus den Versuchen ergibt sich also, daß die Subst. P kein einheitlicher Stoff ist, sondern aus einer blutdrucksenkenden und einer darmerregenden Substanz besteht. Der erstere Bestandteil wird durch Trypsin verdaut, für ihn gilt also die Annahme v. Eulers[3], daß es sich bei der Subst. P um ein Peptid handelt. Eine darmerregende Wirkung hat dieser Bestandteil aber nicht. Den 2. Faktor von P, der die darmerregende Eigenschaft hat, halten wir auf Grund folgender Merkmale für identisch mit dem Darmstoff:

1. quantitativ übereinstimmende Wirkung am Darm verschiedener Tiere[1];
2. keine Beeinflussung der biologischen Wirkung durch Atropin[3, 6] oder Antistin[1, 2];
3. übereinstimmende Wanderungstendenz im Papierchromatogramm;
4. keine Zerstörung durch Trypsin.

Ob die — relativ schwache — blutdrucksenkende Wirkung des Darmstoffs diesem selbst zuzuschreiben ist oder auch auf anderen Begleitsubstanzen beruht, erscheint uns noch nicht genügend geklärt. Ein Darmstoffchromatogramm, das außer am Froschrektum auch am Kaninchenblutdruck ausgewertet wurde, wies jedenfalls Darm- und Blutdruck-

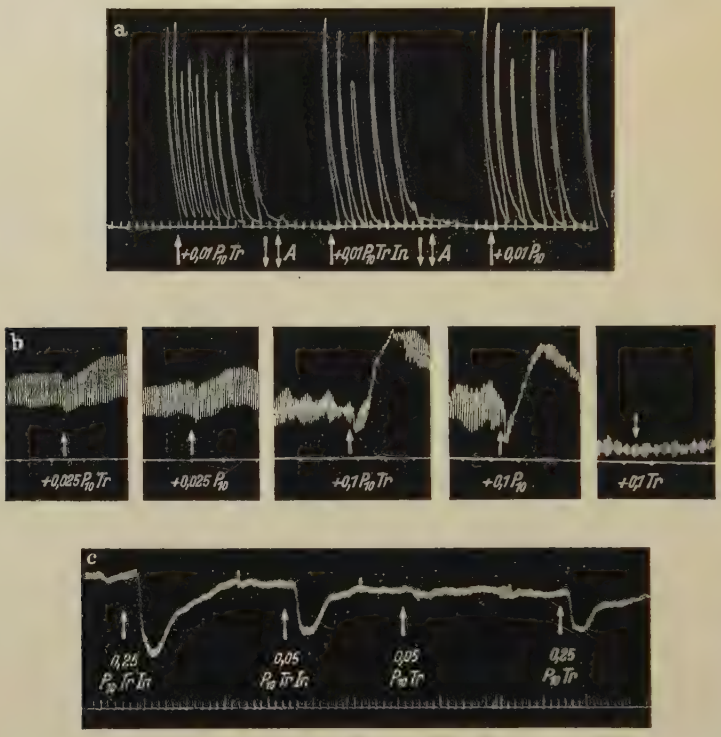


Abb. 2. Wirkung trypsinbehandelter Subst. P. P_{10}Tr. = Trypsinbehandelte Subst. P. P_{10}Tr.In. = mit inaktiviertem Trypsin angesetzte Subst. P. P_{10} = unbehandelte Subst. P. Tr. = Trypsinlösung ohne Subst. P. a) Ausgewaschenes Froschrektum. Vor Kurvenbeginn Atropin 1 : 2 Mill. ↓ ↑ A = wie bei Abb. 1a). Die Hälfte der hier gezeigten Dosis aller 3 Ansätze war wirkungslos. b) Kaninchendünndarm, Atropin 1 : 2 Mill. Zeit 1 min. c) Kaninchenblutdruck. 2 mg/kg Atropin. Zeit 10 sec.

wirkung in der gleichen Fraktion, RF 0,8—1 auf. Außerdem geht die blutdrucksenkende Eigenschaft durch Trypsinbehandlung nicht verloren. Andererseits hatten wir auch Darmstoffextrakte, die den Blutdruck des Kaninchens fast gar nicht senkten, obwohl sie am Froschrektum normale Wirksamkeit zeigten. Vielleicht war hierfür eine individuell verschiedene Empfindlichkeit der Tiere verantwortlich. Vergleiche mehrerer Darmstoffpräparate untereinander am Darm und am Blutdruck dürften diese Frage klären, konnten aber aus Mangel an genügend Ausgangsmaterial noch nicht durchgeführt werden.

Zusammenfassung.

Die Substanz P ist kein einheitlicher Wirkstoff, sondern ist zusammengesetzt aus:

1. einem blutdrucksenkenden, durch Trypsin zerstörbaren Bestandteil von Peptidnatur,

2. einem darmerregenden, möglicherweise gleichzeitig blutdrucksenkenden Stoff, den wir mit dem Darmstoff für identisch halten.

Literatur.

[1] Vogt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 31 (1950). — [2] Kuck u. Vogt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (D) **209**, 71, (1950). — [3] Euler, v.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (D) **181**, 181 (1936). — [4] Rocha e Silva: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (D) **194**, 335 (1940). — [5] Northrop and Kunitz: J. gen. Physiol. **16**, 267 (1932). — [6] Vogt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (D) **206**, 1 (1949).

Dr. W. Vogt, Frankfurt/M-Süd, Pharmakol. Institut, Weigertstraße 3

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 98—104 (1950).

Aus der Wissenschaftlichen Abteilung der Chem. Fabrik
Dr. August Wolff K. G., Bielefeld.

Über den Einfluß des Tagesrhythmus auf den Glykogenansatz in Leber, Herz und Körpermuskulatur nach Invert- und Traubenzuckergaben.

Von
Norbert Gerlich und Heinz Wiele.

(Eingegangen am 10. September 1949.)

In einer experimentellen Arbeit konnten wir[1] nachweisen, daß das äquimolekulare Gemisch, Invertzucker, hungernden Ratten per os gegeben, in Leber und Herz zu einem größeren Glykogenansatz führt als die gleiche Menge Traubenzucker. Die Untersuchungen wurden so durchgeführt, daß die Tiere nach 18stündiger Hungerzeit frühmorgens die Zuckergabe erhielten und am folgenden Morgen um die gleiche Uhrzeit zur Organpräparation getötet wurden.

Berücksichtigen wir aber die Tatsache, daß weiße Ratten ausgesprochen „tagesrhythmische" Tiere sind, so ist die Vorstellung naheliegend, daß der „Tagesthythmus" unter Umständen auch einen Einfluß auf die Glykogenablagerung in Leber, Herz und Körpermuskulatur nach Glukose- und Invertzuckergabe ausübt. In den bereits veröffentlichten Versuchen lagen Tag-Nachtversuche vor. Es war daher interessant, festzustellen, ob die Glykogenablagerung in einem Nacht-Tag-Versuch, wo also die Zuckergabe abends und die Tötung am folgenden Tage ebenfalls abends erfolgte, nicht zu einem anderen Ergebnis führt.

Finden wir einen solchen Unterschied zwischen diesen 24 Std-Versuchen, dann mußte die weitere Aufgabe darin bestehen, festzustellen, ob auch ein Unterschied im reinen Tag- und reinem Nacht-Versuch, also zwischen den 12 Std-Versuchen aufzuzeigen ist.

Lassen sich solche Unterschiede in Abhängigkeit vom „Tagesrhythmus" zeigen, dann würden sich daraus nicht nur wichtige Schlüsse über den Unterschied bezüglich Glykogenablagerungsfähigkeit von Glukose und Invertzucker ergeben, sondern auch wichtige Schlüsse allgemeinphysiologischer Art über das Glykogen-Speicherungsvermögen von Organen.

Versuchsanordnung.

Als Versuchstiere dienten uns 3½—5 Monate alte, gesunde weiße Ratten, die seit Monaten täglich pro Tier 6 g Kartoffelstärke, 1,5 g Trockenhefe, 0,1 g NaCl, 0,1 g Kreide, 1,0 g Trockenmilch und 15 g Hafer erhielten. Jede Versuchsgruppe

bestand aus 20 Tieren, die gewichtsmäßig so verteilt waren, daß alle Gruppen etwa das gleiche Durchschnittsgewicht aufwiesen, und die Einzelgewichte nicht mehr als ± 20 g vom Durchschnitt abwichen. Jede Tiergruppe enthielt gleichviel Männchen und Weibchen. Die Wägung der Tiere erfolgte vor der peroralen Darreichung der Glukose, bzw. des Invertzuckers. Bei jedem Versuch lief eine unbehandelte, aber hungernde Kontrollgruppe mit.

In den ersten beiden Versuchen betrug die Hungerzeit je 18 Std, in den letzten beiden Versuchen je 12 Std. Pro 100 g Körpergewicht erhielten die Tiere 200 mg Glukose, bzw. Invertzucker in 40%iger Lösung per os. Die Glukose stammte von der Fa. Merck-Darmstadt (Glukose pro infusione, wasserfrei), der Invertzucker von der Chemischen Fabrik Dr. August Wolff K. G., Bielefeld (Inversol 40%). Die verabfolgte Zuckerdosis wurde für jedes Tier einzeln errechnet und gegeben. Die Zufuhr der Zuckerlösung erfolgte mittels Pipette. Waren die zu verabreichenden Volumina größer als 1,35 cm³, wurden sie in 2 Portionen kurz hintereinander verabfolgt.

Im allgemeinen nahmen die Tiere die Zuckerlösung gern. Wir achteten aber stets darauf, daß jede Ratte die ihr verabreichte Flüssigkeit gut herunterschluckte. Auslaufen oder Auswerfen der Lösung wurde nie beobachtet.

Die Tötung durch Dekapitieren mittels Schere geschah in den ersten beiden Versuchen 24 Std, in den beiden letzten Versuchen 12 Std nach der Zuckerzufuhr. Sofort nach der Tötung wurden Leber, Herz und ein etwa fingerendgliedgroßes Stück Bauchmuskulatur herauspräpariert und in je einem Wägeglas gesammelt und gewogen. Die Zerkleinerung der Organe erfolgte mit Hilfe eines scharfen Rasiermessers und anschließender Verreibung im Mörser bis zu pastenartiger Konsistenz. Zur Zerkleinerung der Leber benutzten wir in den beiden letzten Versuchen eine Organmühle, rieben den Brei allerdings im Mörser nochmals gut durch. Von einer Verreibung der Organe mittels Sand nahmen wir Abstand, da die oben angeführte Zerkleinerungsmethode für die nachfolgende Glykogenbestimmung auslangte.

Zur Bestimmung des Glykogens bedienten wir uns der modifizierten Pflüger-schen Methode nach Good, Kramer und Somogyi[2], zur Bestimmung des gebildeten Zuckers benutzten wir die Methode von Behre[3] und Kolthoff[4] und in Parallelbestimmungen die bewährte Methode nach Hagedorn-Jensen. Die Glykogenbestimmung zeigte eine durchschnittliche Streuung von ± 5%.

Bei der chemischen Analyse wurden von jedem Organmaterial mindestens 3 quantitative Bestimmungen durchgeführt und der Mittelwert der Ergebnisse verwendet.

Versuchsergebnisse und Besprechung.

Gaben wir 18 Std hungernden weißen Ratten frühmorgens eine bestimmte Menge Glukose, einer anderen Gruppe die gleiche Dosis Invertzucker und töteten die Tiere am folgenden Morgen, so stellten wir fest, daß in diesem 24stündigen Tag-Nacht-Versuch Leber und Herzmuskel nach Invertzucker mehr Glykogen als nach Glukose enthielten. Tab. 1 gibt das Ergebnis wieder.

In der 2. Versuchsreihe erfolgte die Zuckergabe nicht morgens, sondern abends, die Tötung dann ebenfalls am folgenden Abend. Die Tab. 2 zeigt das Ergebnis dieses Nacht-Tag-Versuches.

Im Gegensatz zum vorhergehenden Versuch war hier das Leberglykogen nach Zuckerzufuhr nicht erhöht. Wir fanden im Gegenteil sogar sowohl nach Glukose als auch nach Invertzucker eine Glykogenabnahme.

Tabelle 1. *Tag-Nacht-Versuch.*

Wirkung von 200 mg Glukose bzw. Invertzucker (Inversol)/100 g Ratte auf Leber-, Herz- und Körpermuskel-Glykogengehalt von weißen Ratten bei peroraler Gabe. Hungerzeit 18 Std, Zuckergaben 8.00 Uhr, Tötung am folgenden Tage 8.00 Uhr. Durchschnittswerte von je 20 Tieren.

Gruppe	Durchschnitts-Gewicht g	Dose mg/100 g	Leberglykogen			Herzglykogen			Muskelglykogen		
			mg/g Leber	Streuung	% gegen Kontr.	mg/g Herz	Streuung	% gegen Kontr.	mg/g Muskel	Streuung	% gegen Kontr.
Kontrollen . .	132	—	3,07	±4,5%	—	1,75	±5,1%	—	1,71	±3,9%	—
Glukose. . . .	134,5	200 Glukose	2,96	±4,8%	— 3,6%	1,38	±4,9%	— 7,4%	1,93	±4,6%	+12,9%
Invertzucker .	133	200 Invertzucker	3,73	±4,2%	+21,5%	2,27	±4,9%	+29,7%	1,76	±5,3%	+ 2,9%

Tabelle 2. *Nacht-Tag-Versuch.*

Wirkung von 200 mg Glukose bzw. Invertzucker (Inversol)/100 g Ratte auf Leber-, Herz- und Körpermuskel-Glykogengehalt von weißen Ratten bei peroraler Gabe. Hungerzeit 18 Std, Zuckergaben 20.00 Uhr, Tötung am folgenden Abend 20.00 Uhr. Durchschnittswerte von je 20 Tieren.

Gruppe	Durchschnitts-Gewicht g	Dose mg/100 g	Leberglykogen			Herzglykogen			Muskelglykogen		
			mg/g Leber	Streuung	% gegen Kontr.	mg/g Herz	Streuung	% gegen Kontr.	mg/g Muskel	Streuung	% gegen Kontr.
Kontrollen . .	128,5	—	3,67	±5,0%	—	3,42	±4,3%	—	2,24	±4,8%	—
Glukose. . . .	130,0	200 Glukose	3,51	±4,6%	— 4,4%	2,15	±4,9%	—37,1%	1,12	±5,3%	—50 %
Invertzucker .	129,5	200 Invertzucker	3,08	±4,8%	—16,1%	3,26	±4,5%	— 4,7%	1,99	±4,2%	—11,2%

Auch das Herzglykogen war nicht erhöht, sondern herabgesetzt, besonders stark erniedrigt nach Glukosezufuhr. Auch der Gehalt an Muskelglykogen lag tiefer als bei den unbehandelten Kontrollen, besonders tief nach Traubenzuckerdarreichung.

Allgemein können wir also feststellen, daß im Nacht-Tag-Versuch auf Zuckerdarreichung an hungernden Ratten keine Glykogenzunahme zu erzielen war. Was kann als Erklärung für dieses gegensätzliche Verhalten gelten ? Im Nacht-Tag-Versuch erfolgt die Zuckerzufuhr am hungernden Tier in der beginnenden Nachtphase. Die Nachtphase ist aber bei der albinotischen Ratte die Hauptbewegungsphase, also die Phase, wo Energie nicht gespeichert, sondern umgesetzt wird, die als Bewegung, Wärme usw. in Erscheinung tritt. Am hungernden Tier muß also der in dieser Phase aufgenommene Zucker zur Energielieferung benutzt werden. Als Glykogen wird davon offenbar nichts aufgebaut, auch nicht in der nachfolgenden Tagphase, also der „Ruhephase" der weißen Ratte, denn dann wird bereits der größte Teil der zugeführten Kohlehydratmenge in Energie umgesetzt worden sein. Im Tag-Nacht-Versuch (Versuch 1) liegen die Verhältnisse praktisch umgekehrt. Die Aufnahme des Zuckers erfolgt in der Ruhepause des Tieres, also der Assimilationsphase. Die zugeführte Zuckermenge kann wenigstens teilweise zunächst in dem auf Sparfunktion eingestellten Organismus als Glykogen gespeichert werden. Erst in der nachfolgenden Nachtphase wird das Glykogen, wenigstens teilweise zur Energielieferung mobilisiert.

Wie kommt es aber im Nacht-Tag-Versuch sogar zu einer, besonders am Muskel und Herzen, nach Glukose so beachtlichen Glykogenabnahme? Man könnte geneigt sein, anzunehmen, daß die Zuckergabe in der Bewegungsphase nicht nur der Energielieferung dient, sondern darüber hinaus noch den Anstoß zu einer erhöhten Glykogenmobilisierung gibt. Zur Beantwortung dieser Frage wollten wir daher zunächst feststellen, welches Ergebnis die 12 Std-versuche, und zwar sowohl der reine Tag-Versuch als auch der reine Nacht-Versuch zeitigt. Dementsprechend gingen wir in einer 3. Versuchsreihe so vor, daß wir die Tiere nach 12-stündiger Hungerzeit zunächst morgens 7.30 Uhr mit Zucker fütterten und abends 19.30 Uhr zur Organpräparation töteten. Der Glykogenaufbau mußte sich also in der „Ruhephase" der Tiere abspielen.Das Ergebnis ist in Tab. 3 dargestellt.

Betrachten wir zunächst den Leberglykogengehalt. Es fällt auf, daß lediglich durch Invertzucker eine vermehrte Glykogenablagerung zu erreichen war. Auf Glykosezufuhr kam es sogar zu einer Abnahme des Leberglykogens. Das Herzglykogen erfuhr sowohl nach Inversol wie nach Glukose eine Vermehrung, die besonders nach Invertzucker außerordentlich hoch ausfiel. Wir fanden also auch im 12 Std-Tagversuch bestätigt, daß die Glykogenspeicherung von der Art des zugeführten Zuckers

abhängt. Interessanterweise gelang es im Tag-Versuch weder mit Glukose noch mit Invertzucker, eine Glykogenspeicherung in der Körpermuskulatur zu erzielen; im Gegenteil fand sich hier in beiden Fällen wesentlich weniger Glykogen als bei den unbehandelten Kontrollen. Sogar in der „Ruhepause" des Organismus war es zu einem Glykogenabbau gekommen. Andererseits fanden wir aber besonders nach Invertzucker eine recht beträchtliche Glykogenvermehrung in Herz und Leber. Es wäre also gut denkbar, daß die Zuckerzufuhr am hungernden Organismus in der Assimilationsphase nicht nur zu einer Glykogenspeicherung in bestimmten Depots führt, sondern auch eine Verschiebung der Glykogenvorräte, selbstverständlich nach entsprechender Mobilisation, bewirkt.

Endlich wurde in einer 4. Versuchsreihe festgestellt, welchen Einfluß die „Nachtphase" auf die Glykogenablagerung nach Zuckerzufuhr bei der weißen Ratte ausübt. Zu diesem Zwecke wurden die Ratten nach 12stündiger Hungerzeit abends 19.30 Uhr mit Zucker gefüttert und am folgenden Morgen 7.30 Uhr zur Organpräparation getötet. Die Tab. 4 gibt das Ergebnis wieder.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß in der „Nachtphase" der Leberglykogengehalt nach Invertzucker praktisch unbeeinflußt blieb, nach Glukose dagegen eine deutliche Anreicherung erfuhr. Wir fanden also ein annähernd gegensätzliches Verhalten zum Tagversuch. Ein ähnliches Bild ergibt sich für das Herzglykogen. Auch hier führte Traubenzucker zu einer starken Glykogenablagerung im Herzen, während Invertzucker keinen Einfluß auf den Glykogenhehalt des Herzens ausübte. Am Körpermuskel zeigte sich wie im Tag-Versuch auch im Nacht-Versuch sowohl nach Glukose als auch nach Invertzucker eine Abnahme des Glykogens. Diese Abnahme war sogar größer als im Tagversuch und besonders groß nach Glukosedarreichung. Auch hier wird man sich vorstellen können, daß es nach Zuckerzufuhr am hungernden Tier besonders in der Assimilationsphase zu einem verstärkten Abbau von Muskelglykogen kommt. Ein großer Teil dieses in der „Nachtphase" abgebauten Glykogens wird sicher zur Energielieferung benutzt und nur ein geringer Teil davon in anderen Organen wieder als Glykogen aufgebaut.

Wenden wir uns noch einmal der oben gestellten Frage zu, warum es im Nacht-Tag-Versuch (Tab. 2) sogar zu einer Abnahme des Glykogens, besonders im Muskel, aber auch in Herz und Leber kommt, so dürfen wir wohl allgemein sagen, daß das Ergebnis der Zuckerzufuhr am hungernden Organismus nicht nur durch die Art des dargereichten Zuckers bestimmt wird, sondern auch durch den Zeitpunkt der Gabe. Der zugeführte Zucker wird eben je nach dem Zustand des Organismus entsprechend seiner „Phase" entweder gespeichert oder dient der Energielieferung. Unter Umständen wird sogar noch zusätzlich aus den noch vorhandenen Glykogenreserven des Organismus Zucker zur Energielieferung mobili-

Tabelle 3. *Tag-Versuch.*

Wirkung von 200 mg Glukose bzw. Invertzucker (Inversol) auf Leber-, Herz- und Körpermuskelglykogen von weißen Ratten bei peroraler Gabe. Hungerzeit 12 Std, Zuckergaben 7.30 Uhr, Tötung am gleichen Abend 19.30 Uhr. Durchschnittswerte von je 20 Tieren.

Gruppe	Durchschnitts-Gewicht g	Dose mg/100 g	Leberglykogen			Herzglykogen			Muskelglykogen		
			mg/g Leber	Streuung	% gegen Kontr.	mg/g Herz	Streuung	% gegen Kontr.	mg/g Muskel	Streuung	% gegen Kontr.
Kontrollen . .	141	—	2,81	±5,0%	—	1,65	±4,2%	—	3,03	±5,0%	—
Glukose. . . .	141,5	200 Glukose	2,31	±4,2%	—17,8%	2,21	±5,1%	+33,9%	1,99	±4,8%	—34,3%
Invertzucker .	140	200 Invertzucker	3,32	±4,6%	+18,1%	3,79	±5,3%	+129,7%	1,82	±4,9%	—39,9%

Tabelle 4. *Nacht-Versuch.*

Wirkung von 200 mg Glukose bzw. Invertzucker (Inversol) auf Leber-, Herz- und Körpermuskelglykogen von weißen Ratten bei peroraler Gabe. Hungerzeit 12 Std, Zuckergabe 19.30 Uhr, Tötung am folgenden Morgen 7.30 Uhr. Durchschnittswerte von je 20 Tieren.

Gruppe	Durchschnitts-Gewicht g	Dose mg/100 g	Leberglykogen			Herzglykogen			Muskelglykogen		
			mg/g Leber	Streuung	% gegen Kontr.	mg/g Herz	Streuung	% gegen Kontr.	mg/g Muskel	Streuung	% gegen Kontr.
Kontrollen . .	135,5	—	2,55	±4,9%	—	1,77	±4,9%	—	2,48	±5,1%	—
Glukose. . . .	135	200 Glukose	3,42	±4,8%	+34,1%	3,05	±5,0%	+72,3%	1,06	±4,6%	—57,8%
Invertzucker .	136,0	200 Invertzucker	2,48	±3,9%	—2,7%	1,73	±4,4%	—2,3%	1,48	±4,9%	—40,3%

siert, andererseits wenigstens ein Teil dieses mobilisierten Glykogens wiederum in anderen Organen als Glykogen abgelagert.

Zusammenfassend können wir aus den hier wiedergegebenen Versuchen schließen, daß hinsichtlich des Glykogenspeicherungsvermögens zwischen Glukose einerseits und Invertzucker andererseits recht beträchtliche Unterschiede bestehen. Weiter war festzustellen, daß der Glykogengehalt von Leber, Herz und Muskel nach Zuckerzufuhr nicht nur durch die Art des zugeführten Zuckers bestimmt wird, sondern auch durch den Zeitpunkt der Zuckergabe. Die Ablagerungsfähigkeit für Glykogen nach Zuckerzufuhr hängt vom „Tagesrhythmus", also der Gesamtlage des Organismus ab.

Weiter läßt sich schließen, daß es unter Umständen gelingt, durch Zuckerzufuhr am hungernden Tier Glykogen zu mobilisieren, das offenbar entsprechend der jeweiligen Grundphase des Körpers mit dem zugeführten Zucker der Energielieferung dient, teilweise wohl aber auch in anderen Organen wiederum als Glykogen erscheint.

Für die praktische therapeutische Anwendung ergäbe sich — natürlich mit dem nötigen Vorbehalt — daraus die Folgerung, daß es bei der Zuckertherapie eben nicht nur auf die Art des dargereichten Zuckers ankommt, sondern ebenso sehr auf die Wahl des Zeitpunktes der therapeutischen Gabe.

Literatur.

[1] Blume, W., N. Gerlich, u. H. Wiele: Z. inn. Med. **5**, (1950). — [2] Good, Kramer and Somogyi: J. of biol. Chem. **100**, 485 (1933). — [3] Behre: Z. Unters. Lebensmitt. **41**, 826 (1921). — [4] Kolthoff: Z. Unters. Lebensmitt. **45**, 131 (1923).

Dr. med. N. Gerlich, Bielefeld, Wissenschaftl. Abt.
Chem. Fabr. Dr. August Wolff.

Archiv exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 105—110 (1950).

Aus der Forschungsabteilung der Knoll A.-G., Ludwigshafen am Rhein.

Über die Wirkung steigender, überhoher Dauergaben von Veritol (β-[p-Oxyphenyl-]isopropylmethylamin) im Tierversuch.

Von

Wilhelm Biehler.

(Eingegangen am 2. August 1949.)

Die Bestimmung der akut toxischen Dosis eines Heilmittels sagt noch nichts aus über seine Verträglichkeit bei wiederholter Verabreichung. Die tödliche Einzeldosis kann scheinbar niedriger werden durch Kumulation, höher durch Gewöhnung. Da von dem Kreislauf- und Kollapsmittel Veritol bisher nur die Ergebnisse akuter Vergiftung bekannt geworden sind[1], soll im folgenden über Versuche mit oft wiederholten, steigenden Gaben berichtet werden.

Die Auswirkungen des Veritols wurden verfolgt am Verhalten des Körpergewichtes der Versuchstiere (z. B. neugeborener, heranwachsender Geschwisterhunde). Ferner wurde dem Verhalten des Blutbildes Aufmerksamkeit geschenkt. Das weiße Blutbild ließ keine gesetzmäßigen Veränderungen erkennen; es sind deshalb nur die Werte für Hämoglobin und Erythrozyten besprochen.

Nach Abschluß der einzelnen Versuche wurden die Tiere getötet und vor allem die großen Gefäße und das Herz makroskopisch und zum Teil mikroskopisch beschaut. (Eine geplante mikroskopische Spezialuntersuchung des Reizleitungssystems konnte nicht durchgeführt werden, da das Beobachtungsgut den Kriegseinwirkungen zum Opfer fiel.) Die Versuche wurden in den Jahren 1937 bis 1941 durchgeführt.

Der Versuchsverlauf war folgender:

A) Versuche an Kaninchen:

Kanin 21	Anfangsgewicht	am 6. Januar 1937		3,60 kg
	Endgewicht	am 15. Oktober 1937		3,95 kg
	Veritol oral	1 mg/kg	an 52 Werktagen, insgesamt	190 mg
		2	20	148
		4	50	730
		8	20	570
		16	7	400
		32	6	690
		64	69	10 620
			224 Tage	13,35 g

[1] Biehler: Z. exper. Med. **101**, 62 (1937). — Lindner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **187**, 444 (1937).

Der Tod trat am 15. Oktober mittags 15 Uhr ein: Herz prall mit Blut gefüllt; Lungen dunkelrot, hepatisiert. Diagnose: Lungenentzündung.

Während des Lebens hatte das Tier keine auffällige Reaktion auf die Veritolverabreichungen erkennen lassen. Die großen Gefäße waren glatt, die Oberfläche glänzend; keine Nekrosen, keine Anzeichen von Cholesterin- oder Kalkeinlagerung.

Kanin 22 Anfangsgewicht am 6. Januar 1937 2,60 kg
Endgewicht am 6. Mai 1938 4,07 kg

Veritol oral	1 mg/kg	an 53	Werktagen, insgesamt	138 mg
	2	20		108
	4	50		540
	8	20		440
	16	5		225
	32	6		690
	64	225		54 700
	100	20		8 200
subkutan	100	1		410
		400	Tage	65,45 g

Der Tod trat ein beim Übergang von der oralen zur subkutanen Verabreichung, auf die hin das Tier zum ersten Male auffällige Zeichen von Erregung zu erkennen gab. Die Sektion zeigte, daß der Magen geplatzt war. Das Tier ist sehr fett, die Leber brüchig, Vorhöfe prall mit Blut gefüllt. Lunge o. B. Schilddrüse auffallend groß. Große Gefäße glatt und glänzend; keine Nekrosen, keine Kalkeinlagerungen.

B) Versuche an Katzen:

I. Katze „Veritoline".

Der Versuch wurde in 2 Abschnitten durchgeführt. Über das Verhalten des Körpergewichtes gibt folgende Übersicht Aufschluß.

1. Versuchsabschnitt:

Anfangsgewicht	am 6. Januar 1937	1,35 kg
Höchstgewicht	am 18. Mai 1937	2,25 kg
Schlußgewicht	am 4. August 1937	1,55 kg

Das Tier erhielt Veritol sulfuricum in entsprechender Verdünnung mit der Pipette eingeträufelt. Gelegentlich kam es zu Erbrechen. Die Gaben waren:

1 mg/kg	oral ...	an 50	Werktagen, insgesamt	83 mg
2		20		76
4		50		420
8		20		360
16 mg/kg	subkutan	8		270
32		5		340
64		16		370
		169		3,24 g

Bei diesem Tier waren deutliche Veritolwirkungen zu beobachten. Zunächst zeigte es bei den Gaben von 4 bzw. 8 mg/kg oral nach der Einträufelung deutlich gesteigerte Lebhaftigkeit. Ein übergroßer Spieltrieb, ja eine gewisse Streitsucht machten sich unangenehm und im Labor, wo das Tier frei umherlief, oft störend

bemerkbar. Die Wirkung hielt zu Beginn der Verabreichung (und beim Übergang auf eine höhere Dosis) mehrere Stunden an, klang aber nach einiger Zeit, augenscheinlich durch Gewöhnung, rascher ab. Die Wirkung der höheren Dosen, die noch dazu subkutan verabreicht werden mußten, war beträchtlich. Nach der Injektion dilatierte die Pupille maximal. Das Tier ging unsicher, mit wiegenden Bewegungen. Oft stand es ruhig mit etwas gespreizten Vorderbeinen, während der leicht gesenkt gehaltene Kopf dauernd nach rechts und links hin- und herpendelte. Dann ging die Katze wieder 3 Schritte vor, 3 Schritte zurück. Die Nahrungsaufnahme war stark behindert; eine Maus wurde zunächst überhaupt nicht beachtet, dann (vermutlich infolge der maximal weiten Pupillen) nicht richtig lokalisiert, d. h. die Katze stieß mit dem Kopf immer wieder rechts oder links an dem Zielpunkt vorbei. Das Fell, besonders der Schwanz, war buschig gesträubt. Nach einigen Stunden klangen zwar die Erscheinungen ab. Trotzdem war die Nahrungsaufnahme so stark herabgesetzt, daß das Tier rasch abmagerte und deshalb der Versuch zunächst einmal am 4. August 1937 abgebrochen wurde. In der darauf folgenden Zeit erholte sich die Katze; das Gewicht stieg, zuerst steil, dann langsamer an.

2. Versuchsabschnitt:

Gewicht	am	1. Dezember 1937	1,85 kg
Schlußgewicht ...	am	15. Juni 1938	2,15 kg
5 mg/kg oral ..	an	30 Werktagen, insgesamt	285 mg
10	20		440
20	5	}	
20 mg/kg subkutan	35	}	1 680
40	30		2 530
80	43		6 880
	an	163 Tagen insgesamt	15,05 g

Die Katze vertrug das Veritol zunächst wesentlich besser als im 1. Versuchsabschnitt; erst auf 20 mg/kg oral erbrach sie und wehrte sich an den nächsten Tagen gegen die Eingabe, so daß zur subkutanen Verabreichung geschritten wurde. Die jetzt (im Februar 1938) recht lebhaften unangenehmen Folgeerscheinungen klangen jedoch mehr und mehr ab (merkbar auch im Verhalten des Körpergewichtes!). Diese Gewöhnung war nun immer wieder beim Übergang auf höhere Dosen zu sehen, so daß schließlich auch die höchsten Gaben (80 mg/kg) bei ansteigendem Körpergewicht gut vertragen wurden. Letztere Dosis ist das rund $1^1/_2$fache der akut tödlichen und das 800fache der mit 0,1 mg/kg sicher nicht zu nieder angesetzten, bei der normalen Katze minimal wirksamen Veritolgabe! (Es sei jedoch ausdrücklich vor dem voreiligen Schluß gewarnt, auch beim Menschen könne die therapeutische Dosis ohne Nebenerscheinungen um das 800fache überschritten werden.)

Da kein Ende des 2. Versuchsabschnittes abzusehen war, wurde das Tier am 15. Juni 1938 getötet und seziert. Das makroskopische Ergebnis war völlig negativ; die mikroskopische Durchforschung ergab lediglich eine unspezifische Abszeßbildung in den Nieren.

II., III. Kater „grauschwarz" und „graugrün".

Diese Versuche sollten Aufschluß über das Verhalten des Blutbildes geben. Kater „grauschwarz" war das empfindlichere Tier. Beide Kater vertrugen die arithmetisch steigenden Veritoldosen sehr gut, lediglich am 7. Mai 1940 reagierte Kater „grauschwarz" auf die Injektion mit Aufregung, Fauchen, gesträubtem Haar und

weiten Pupillen. Als Veritolfolge sieht man eine zunächst deutliche Abnahme der Erythrozytenzahl, welche aber dann gleichbleibt und sogar wieder ansteigt, wenn die Veritolgabe für einige Zeit auf gleicher Höhe bleibt. Das Hämoglobin zeigt, zumal bei Kater „grauschwarz", zunächst ein gegensätzliches Verhalten, es steigt sogar an und fällt erst später ab, wenn die Erythrozytenzahl um ein Gleichgewicht schwankt. Bei Kater „graugrün" gingen beide Größen mehr parallel.

Kater „grauschwarz", der vorübergehend am 14. Juni und 21. Juni Zucker, d. h. reduzierende Substanzen, im Harn gehabt hatte (aber *kein* Azeton, keine Azetessigsäure), starb am 30. Juli 1941 an Lungenödem aus nicht geklärter Ursache.

Der Versuch an Kater „graugrün" wurde am 22. November 1941 abgebrochen, da er keine weiteren Erkenntnisse mehr versprach.

C) Versuche an Hunden:

Ein erster Versuch kann kurz abgehandelt werden:

Kontrollhund	Anfangsgewicht	2. April 1937	—	330 g
	Endgewicht	15. Juni 1938	—	19,3 kg
Hund — hellgrau	Anfangsgewicht	2. April 1937	—	380 g
Veritol subkutan	Endgewicht	15. Juni 1938	—	11,6 kg
Hund — rotbraun	Anfangsgewicht	2. April 1937	—	340 g
Veritol oral	Endgewicht	9. Februar 1938	—	11,4 kg

Gaben:

Hund — hellgrau:

0,5 mg/kg subkutan an	50 Werktagen, insgesamt	23 mg
1	20	32
2	10	43
4	10	110
8	33	9 200
20	40	9 900
40	25	12 500
60	66	46 500
	254 Tage	78,3 g

Hund — rotbraun:

1 mg/kg oral an	51 Werktagen, insgesamt	45 mg
2	20	54
4	10	66
8	10	172
16	150	15 910
50	13	7 400
	254 Tage	23,65 g

Wie aus der Angabe der Gewichte hervorgeht, waren die beiden Veritolhunde stark im Gewicht zurückgeblieben. So ergab sich eine auffallende Ähnlichkeit mit einer Abbildung, die LUCKE[1] von dreien seiner Versuchshunde in jener Zeit veröffentlicht hatte; auch das von LUCKE für Nebennieren-Mangel-Zustände als auffällig

[1] LUCKE: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **187**, 409 (1938).

bezeichnete Zurückbleiben des Unterkiefer-Wachstums war bei unseren Veritolhunden zu beobachten. Nach der Tötung und Sektion der Tiere zeigte sich jedoch sehr rasch, daß die Knochen keineswegs zierlich oder arm an Kalksalzen waren, wie dies Lucke als charakteristisch beschreibt, sondern im Gegenteil ganz außerordentlich dick und kräftig. Im übrigen ergab sich weder makroskopisch noch mikroskopisch ein nennenswerter Befund; die Ähnlichkeit mit Luckes Versuchshunden war also wohl nur zufällig.

Das Zurückbleiben der beiden Versuchshunde (Rotbraun und Hellgrau) im Wachstum war jedoch so auffällig gewesen, daß es einer nochmaligen Kontrolle unterzogen wurde, zumal sich Bedenken geltend machten, ob bei diesen Kindern eines sehr ungleich großen Elternpaares verschiedener Rasse das Ergebnis nicht vielleicht erbbedingt war. Es wurde also mit 6 möglichst gleichgewichtigen Geschwistern aus einem einheitlichen Wurf von 8 Hunden ein neuer Versuch begonnen und in 2 Abschnitten durchgeführt.

Hund	kg	1. Abschnitt 18.3.38 — 20.6.38	kg	2. Abschnitt 21.6.38 — 16.1.39	kg
Schwarzgrau . .	0,27	Kontrolle	6,70	subcutan	19,5
Schwarz	0,27	Kontrolle	7,40	oral/subct.	24,5
Molli	0,33	oral	5,90	oral	20,5
Quack	0,30	oral	4,80	Kontrolle	21,0
Struppi	0,27	subcutan	5,30	subcutan	17,8
Kleingrau . . .	0,30	subcutan	4,20	Kontrolle	20,5

Wie man sieht, hatten sich im ersten Versuchsabschnitt die Kontrollhunde gewichtsmäßig besser entwickelt; es wurden deshalb diese Tiere in den Versuch einbezogen und dafür die beiden leichtesten Tiere als Kontrollhunde weitergeführt. Langsam glichen sich nun die weiteren Zunahmen aus. Mitte Januar 1939 wurden dann 4 Tiere getötet. Die 2 Hunde „Schwarz" und „Quack" wurden weiterbeobachtet. Die zwischen beiden bestehende Gewichtsdifferenz glich sich nicht aus. (Die Tiere mußten später zu andersartigen Versuchen benützt werden.)

Einen Überblick über die den Versuchshunden verabreichten Veritolgaben gibt die folgende Tabelle:

Molli: oral: 3 mg/kg × 25 + 6 mg/kg × 50 + 12 mg/kg × 20 + 25 mg/kg × 20 + 50 mg/kg × 138.

Quack: oral: 3 mg/kg × 25 + 6 mg/kg × 50. Weiter als Kontrolle.

Struppi: subkutan: 1 mg/kg × 25 + 2 mg/kg × 50 + 4 mg/kg × 20 + 10 mg/kg × 20 + 20 mg/kg × 138.

Kleingrau: subkutan: 1 mg/kg × 25 + 2 mg/kg × 50. Weiter als Kontrolle.

Schwarzgrau: Kontrolle, sct physiologische Kochsalzlösung; weiter subkutan: 4 mg/kg × 20 + 10 mg/kg × 20 + 20 mg/kg × 140.

Schwarz: Kontrolle, Kochsalz oral; weiter: oral: 12 mg/kg × 20 + subkutan 25 mg/kg × 20 + 35 mg/kg × 213.

Irgendwelche Schädigungen, die sich auf die Veritolverabreichung zurückführen ließen, waren nicht zu beobachten. Nekrosen, Cholesterin- oder Kalk-Einlagerungen konnten an den großen Gefäßen nicht gefunden werden. Das ganze Sektionsergebnis war makroskopisch und mikroskopisch negativ. So starke Unterschiede im Habitus wie im ersten Hundeversuch waren nicht aufgetreten.

Zusammenfassung.

1. Verabreichung steigender, bis überhoher Veritolgaben führte in Versuchen an Kaninchen, Katzen und Hunden zu keiner Veränderung der Aortenwand.

2. Sie führte bei wachsenden, jungen Hunden zu einem Zurückbleiben in Gewicht und Körpergröße; bei einer Katze zu Gewichtsstürzen bei jeweiliger Gabensteigerung, jedoch auch zu Gewöhnung und Erholung.

3. Die Erythrozytenzahl zeigte bei Dosensteigerung ein Absinken (bei 2 Katern). Doch war auch hier Erholung zu beobachten.

Dr. W. Biehler, (22b) Ludwigshafen, Frankenthaler Str. 196.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 111—118 (1950).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky).

Über die synergistische Wirkung von Barium-Ionen und Acetylcholin.

Von
Heinz Lüllmann.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 22. August 1949.)

Einleitung.

Zahlreiche Untersuchungen haben sich mit der Wirkung hoher Barium-Ionen-Konzentrationen beschäftigt. Sie ergaben, daß Barium ein rein muskuläres Krampfgift ist. Der Konzentrationsbereich erstreckt sich von etwa 1 : 50—1 : 10000. Glatte, quergestreifte und Herzmuskulatur werden zur Kontraktur gebracht[1–5]. Dagegen konnte Führer[6] in seinen Versuchen an der Skelettmuskulatur des Frosches zeigen, daß neben dem muskulären Angriffspunkt den Barium-Ionen noch ein weiterer zukommt, der nach einer zweiten Untersuchung von ihm[7] an der motorischen Endplatte lokalisiert ist.

Dieser neuromuskuläre Wirkungsmechanismus der Barium-Ionen wurde dann bestätigt durch Untersuchungen von Roth[8] am Froschdarm, Gohara[9] am elektrisch gereizten Samenstrang, von Weger[10] am Uterus, von Russo[11] und Scaffidi[12] an der Krötenmuskulatur, am Warmblüterdarm von Chistoni[13] und Baur[14] und schließlich durch Stavraki[15], der zeigen konnte, daß der salivatorische Effekt von Bariumchlorid (0,005—0,01 i. v.) bei Hund und Katze durch Atropin zu unterdrücken ist. Über die Beziehungen zwischen Barium-Ionen und Adrenalin liegen Berichte von Roth[8], Inoue[16] und Raymond-Hamet[17] vor, die unter anderem aussagen, daß die Barium-Kontraktur oder -Erregung durch Adrenalin zu durchbrechen ist.

Da Ergebnisse über das Verhältnis zwischen Barium-Ionen und Azetylcholin nicht bekannt sind, ist diese Arbeit der Frage gewidmet, welche Beziehungen zwischen diesen beiden Substanzen am isolierten Organ bestehen.

Methodik.

Folgende Organe wurden von uns untersucht: Ileum der Ratte, Uterus der Maus und der Ratte, Ureter des Hundes und der Katze, Samenblase des Goldhamsters, Ringmuskulatur des Froschmagens, der M. rectus abd. und das Froschherz.

Die isolierten Organe wurden nach der Methode von Magnus in sauerstoffdurchperlter Tyrode-Lösung aufgehängt, als Schreiber dienten teils Schwedenhebel, teils Suspensionsschreiber. Die Organe entnahmen wir sofort dem getöteten Tier,

um sie dann dem Versuch zu unterwerfen; nur die Ureteren des Hundes und der Katze verblieben 9—6 Std im Kühlschrank. Für die Versuche mit den Froschorganen wurden Ranae temporariae in den Monaten Mai bis Juli verwandt. Das Herz wurde in STRAUBscher Anordnung und der M. rectus mit der MAGNUS-Methode untersucht. Die Ringmuskulatur des Froschmagens wurde dadurch erfaßt, daß 6—8 Ringe, die senkrecht zur Längsachse des Magens geschnitten waren, aneinander gebunden wurden, so daß eine Kette entstand.

Als lösliches Bariumsalz benutzten wir ausschließlich Bariumchlorid ($BaCl_2$ plus 2 H_2O) pro anal.

Versuchsergebnisse.

1. Ileum der Ratte.

Bariumchlorid rief in der Verdünnung 1 : 10^5 am Rattenileum eine mäßige Steigerung des Tonus hervor, die auswaschbar und im gleichen

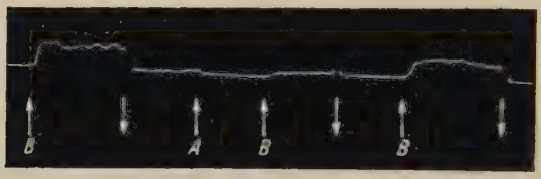


Abb. 1. Hemmung des Bariumchlorid-Effektes durch Atropin. Ileum der Ratte. B: Bariumchlorid 1 :10^5. A: Atropin 1 : 10^7. ↓ : 3mal Auswaschen.

Ausmaß zu reproduzieren war. Am ermüdeten Ileum war eine solche Dosis nicht mehr wirksam. Dann verstärkte aber diese unterschwellige Barium-Gabe den nachfolgenden Azetylcholin-Effekt auf etwa das Doppelte. Die Azetylcholin-Ansprechbarkeit lag zwischen 1 : 10^8 und 1 : 10^{10}.

Der Bariumchlorid-Effekt 1 : 10^5 wurde durch eine vorhergehende Gabe von Atropin 1 : 10^7 abgeschwächt, einige Male sogar aufgehoben (Abb. 1). Adrenalin 1 : 10^7 durchbrach die Tonussteigerung, die durch Bariumchlorid 1 : 10^5 ausgelöst wurde.

2. Uterus der Maus.

Der Uterus zeigte rhythmische Spontanbewegungen, deren Frequenz durch Bariumchlorid 1 : 10^4—1 : 10^5 erhöht wurde. In manchen Fällen, in denen die Spontanbewegungen durch häufiges Auswaschen zum Erlöschen gekommen waren, wurden diese durch obengenannte Barium-Konzentration wieder in Gang gesetzt, dasselbe war durch wiederholte Gaben von Azetylcholin 1 : 10^7 zu erreichen (Abb. 2).

3. Uterus der Ratte.

Ebenso wie am Uterus der Maus wirkte auch hier Bariumchlorid 1 : 10^4—1 : 10^5 frequenzerhöhend oder Spontanbewegung auslösend. Azetylcholin 1 : 10^6 zeigte denselben Effekt auf die Spontanbewegung.

4. Ureter des Hundes.

Bariumchlorid 1 : 10^4, Azetylcholin 1 : 10^5 und Adrenalin 1 : 10^5 zeigten keinen Einfluß auf die isotone Kurve. Erst nach wiederholten Gaben Azetylcholin 1 : 10^6 antwortete das Organ auf Bariumchlorid 1 : 10^4 bis 1 : 5×10^4 mit einer lang anhaltenden, ryhthmischen Bewegung, die mit dem Auswaschen sofort aufhörte. Dieser Effekt war beliebig zu wiederholen. Atropin 1 : 10^6 unterdrückte die Auslösung der Spontanbewegung oder schwächte die Höhe der Einzelkontraktion.

5. Ureter der Katze.

Wie am entsprechenden Organ des Hundes riefen Azetylcholin und Adrenalin keine Wirkung hervor. Dagegen lagen die Bariumchlorid-

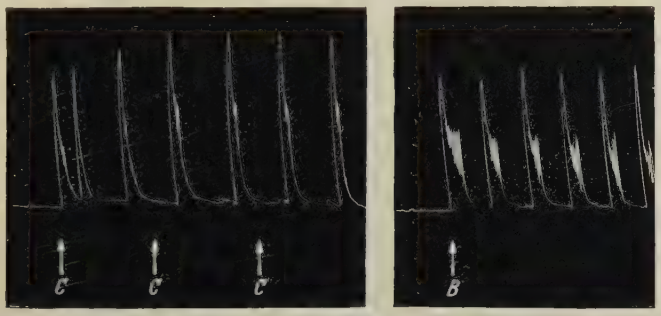


Abb. 2. Rhythmikauslösende Wirkung von Azetylcholin und Bariumchlorid. Uterus der Maus. C: Azetylcholin 1 : 10^7. B: Bariumchlorid 1 : 7×10^4.

Konzentrationen, die rhythmikauslösend wirkten, etwas höher, nämlich zwischen 1 : 2×10^3 und 1 : 7×10^3. Außerdem bedurfte es keiner vorhergehenden Azetylcholin-Gaben. Atropin ließ keine hemmende Wirkung erkennen. Bariumchlorid 1 : 10^3 führte bereits zu einer auswaschbaren Kontraktur, die am Ureter des Hundes erst durch die 5—8fache Konzentration ausgelöst wurde.

6. Samenblase des Goldhamsters.

An diesem Organ konnten nur 2 orientierende Versuche unternommen werden. Eine Azetylcholin-Gabe 1 : 10^5 wurde mit einer Kontraktion beantwortet. Dieser Effekt erfuhr durch eine vorhergehende Bariumchlorid-Dosis 1 : 10^4—1 : 10^5 eine Verstärkung um das 2—3fache der Ausgangshöhe. Nach Vorbehandlung mit Bariumchlorid 1 : 10^4 wies der abfallende Schenkel des Azetylcholin-Effektes schwache Spontanbewegungen auf. Bariumchlorid bis zur Konzentration 1 : 10^4 zeigte keine Eigenwirkung.

7. Ringmuskulatur des Froschmagens.

Bariumchlorid-Konzentrationen bis 1 : 10^5 ließen keinen Effekt erkennen, 1 : 10^4 jedoch führte zu einer Tonussteigerung und Auslösung

von Spontanbewegungen. Auf Azetylcholin 1 : 10^6 zeigte das Organ eine stetig reproduzierbare Kontraktion. Nach Bariumchlorid 1 : 10^5—1 : 10^6 war die nächstfolgende Azetylcholin-Kontraktion um ein Drittel bis ein Fünftel höher als die Azetylcholin-Vergleichseffekte (Abb. 3). Die Azetylcholin-Wirkung nach einer Bariumchlorid-Gabe 1 : 10^4 war um das 2 bis 3fache stärker, auch der 2. und 3. Effekt zeigte noch eine Steigerung.

Abb. 3. Verstärkung des Azetylcholin-Effektes durch Bariumchlorid. Ringmuskulatur des Froschmagens. C: Azetylcholin 1 :10^6. B: Bariumchlorid 1 : 10^5. ↓ : 3 mal Auswaschen.

8. M. rectus abdominis.

Azetylcholin (Konzentration 1 : 10^6—1 : 10^7) rief konstant reproduzierbare Effekte hervor. Bariumchlorid 1 : 10^4 zeigte keine Eigenwirkung, verstärkte jedoch die folgenden Azetylcholin-Gaben auf ein Vielfaches, die zuerst folgende um das etwa 5fache, die späteren Effekte mit zunehmendem zeitlichen Abstand weniger deutlich. Die Wirkungsdauer einer Barium-Gabe betrug trotz wiederholten Auswaschens zwischen 2 und 3 Std. Außerdem ließ sich nach dem ersten verstärkten Azetylcholin-Effekt der Ruhetonus nicht wiedergewinnen, dieser wurde auch erst nach 2—3 Std erreicht. Der Abstand von einer Azetylcholin-Gabe bis zur nächsten betrug immer 30 min (Abb. 4).

9. Froschherz.

Bariumchlorid führte in Konzentrationen zwischen 1 : 10^5 und 1 : 10^7 zu einer leichten Hebung des diastolischen Tonus. Die Wirkung dieser Gaben wurde durch wiederholte Azetylcholin-Applikation (Konzentration

1 : 10^9—1 : 10^{15}) um das 10—1000fache verstärkt, denn es trat jetzt nach derselben Barium-Dosis, die vorher einen minimalen Effekt zeigte, sofortige Abnahme der Amplitude ein, die innerhalb kurzer Zeit (etwa 30 sec) zum Herzstillstand in mäßiger Systole, einige Male auch in Diastole, führte.

Auch das Umgekehrte war zu beobachten, nämlich Veränderung des Azetylcholin-Effektes durch dazwischenliegende, minimal wirksame Barium-Gaben. Entweder zeigte der Azetylcholin-Effekt eine verstärkte Reduktion der Amplitude und zeitliche Verlängerung oder das Azetylcholin führte zum Stillstand der Kammer in Diastole bei regelmäßig schlagenden Vorhöfen. Nicht immer war der Block ein totaler, so daß die Kammer vereinzelte Zuckungen durchführte. Einige Male konnte

Abb. 4. Verstärkung des Azetylcholin-Effektes durch Bariumchlorid. M. rectus abd. ranae temporariae. a) Normaler Azetylcholin-Effekt. b) Azetylcholin-Effekt nach vorhergehender Bariumchlorid Gabe. c) Azetylcholin-Effekt nach Abklingen der Bariumchloridwirkung, 2 Std später. C: Azetylcholin 1 : 10^6.

auch beobachtet werden, daß die Vorhöfe stillstanden und dilatiert waren. Diese Acetylcholin-Effekte waren jeweils auswaschbar. Jedoch zeigte die Amplitude nach 2—4stündiger, kombinierter Gabe von Azetylcholin und Bariumchlorid (Abstand von Gabe zu Gabe etwa 10 min) einen wesentlichen Verlust an Höhe.

Auf das sich in diesem Zustand befindende Organ wirkte Atropin (Konzentration 1 : 10^5—1 : 10^6) qualitativ verändert, denn hier führte das Alkaloid zu einer langwährenden Verbesserung der Amplitude, während es am frischen Herzen, das lediglich einige eben wirksame Bariumchlorid-Gaben erhalten hatte, in gleicher Verdünnung zu einer leichten Hebung des diastolischen Tonus, also zu einer Abnahme der Amplitude, führte. Dieser Effekt des Atropins glich dem des Bariumchlorids am frischen Herzen. So steigerte Barium, das in diese Atropin-Wirkung hineingegeben wurde, auch nicht mehr den diastolischen Tonus. Eine weitere Wirkung des Atropins war die Hemmung des zum Herzstillstand führenden Bariumchlorid-Effektes (1 : 10^5—1 : 10^7), der am mit minima-

len Azetylcholin-Dosen vorbehandelten Herzen hervorzurufen war. Atropin konnte zwar eine starke Reduktion der Amplitude durch Barium nicht verhindern, jedoch kam es zu keinem Herzstillstand. Diese Atropin-Wirkung ließ sich nur einige Male zeigen. Die Konzentration des Atropins war um das 2—10fache niedriger als die des Bariumchlorids.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

In vorstehenden Versuchen sind Barium-Ionen-Konzentrationen angewandt worden, die unterhalb derjenigen liegen, die eine muskuläre Krampfwirkung hervorruft. Somit ist zu überlegen, ob für die beobachteten Wirkungen ein anderer Angriffspunkt in Betracht kommt. Für einen mit dem Azetylcholin im Zusammenhang stehenden Angriffspunkt sprechen die Versuchsergebnisse, die sich unter folgenden 3 Gesichtspunkten ordnen lassen:

1. Beeinflussung der rhythmischen Spontanbewegung,
2. Wechselseitige Verstärkung von Barium-Ionen und Azetylcholin,
3. Abschwächung der Barium-Ionen-Wirkung durch Atropin.

Der zur Erhaltung oder Auslösung rhythmischer Spontanbewegungen notwendige Stoff ist Azetylcholin, wie gerade in neuester Zeit Bülbring und Burn[18] und Burn und Vane[19] zeigen konnten. Auch unsere Versuche sprechen dafür, denn am Uterus der Maus und der Ratte ließen sich die Spontanbewegungen durch Azetylcholin hervorrufen oder bei ihrem Bestehen in ihrer Frequenz steigern. Denselben Effekt konnten wir durch Bariumchlorid erzielen, so daß Azetylcholin und Barium-Ionen hier gleichsinnig wirkten.

Ebenso konnten wir beobachten, daß Barium-Ionen Spontanbewegungen am Kaninchenherzohr nach Bülbring und Burn[18] auslösten.

Wenn Barium-Ionen die Spontanbewegung so beeinflussen, als wäre Azetylcholin appliziert worden, so war zu vermuten, daß diese auch den Azetylcholin-Effekt beeinflussen würden. Dies konnte an verschiedenen Organen gezeigt werden. Auch das Umgekehrte, nämlich die Verstärkung der Barium-Wirkung durch vorhergehende Azetylcholin-Gaben war, wenn auch weniger leicht, zu demonstrieren.

Überlegungen über den möglichen Wirkungsmechanismus der Barium-Ionen führten uns dazu, Atropin auf den Bariumchlorid-Effekt einwirken zu lassen. Dabei sahen wir, daß am Ileum der Ratte fast regelmäßig die Barium-Wirkung stark abgeschwächt oder aufgehoben war, während dieser Antagonismus an den anderen von uns untersuchten Organen nur in einigen Fällen wirksam wurde.

Aus den Versuchen von Bülbring und Burn geht weiterhin hervor, daß eine einzige Dosis Azetylcholin zum nicht mehr schlagenden Herzohr die Azetylcholin-Synthese im Gewebe auf Stunden hinaus wieder in Gang

bringt. In Analogie dazu möchten wir schließen, daß die Barium-Ionen fördernd auf die das Azetylcholin aufbauende Cholinazetylase oder hemmend auf die das Azetylcholin abbauende Cholinesterase wirken.

Über die Aktivatoren und Hemmstoffe der Cholinesterase liegen in der Literatur widersprechende Angaben vor, so berichtet Nachmansohn[20], daß Barium-Ionen auf die Cholinesterase aktivierend wirken, während Frommel, Herchberg und Picquet[21] zum gegenteiligen Ergebnis kommen. Auf der anderen Seite liegt der Befund von Feldberg und Hebb[22] vor, die den Einfluß von Ionen auf die Azetylcholin-Synthese in dialysierten Extrakten aus Hirngewebe prüften. Sie fanden, daß die Anwesenheit zweiwertiger Ionen (Magnesium und Mangan) notwendig ist. Barium scheint nicht untersucht zu sein. Somit läßt sich aus den in-vitro-Versuchen kein Schluß ziehen.

Zusammenfassende Übersicht.

Beeinflussung der rhythmischen Spontanbewegungen durch Barium-Ionen. H = Hemmung, E = Erregung, A = Auslösung, *Ach* = Acetylcholin.

Organ	Barium-Ionen-Konzentrationen	Art der Wirkung	Mit oder ohne Ach.-Vorbehandl.	Anzahl der Versuche
Froschherz	$1:10^5 - 1:10^7$	H	mit *Ach*	über 10
Uterus der Maus	$1:10^4 - 1:10^5$	E (A)	ohne *Ach*	10
Uterus der Ratte	$1:10^4 - 1:10^5$	E (A)	ohne *Ach*	6
Ureter des Hundes	$1:10^4 - 1:5\times10^4$	E A	mit *Ach*	über 10
Ureter der Katze	$1:2\times10^3$—$1:7\times10^3$	E A	ohne *Ach*	über 10
Magen des Frosches	$1:10^4$	E A	ohne *Ach*	4

Verstärkung der Acetylcholin-Wirkung durch Barium-Ionen.

Organ	Acetylcholin-Konzentrationen	Barium-Ionen-Konzentrationen	Anzahl der Versuche
Froschherz	$1:10^9 - 1:10^{15}$	$1:10^6 - 1:10^7$	über 10
M. rectus abd.	$1:10^6 - 1:10^7$	$1:10^4$	über 10
Magen des Frosches	$1:10^6$	$1:10^4 - 1:10^6$	8
Samenblase des Goldhamsters	$1:10^5$	$1:10^4 - 1:10^5$	2
Ileum der Ratte	$1:10^8 - 1:10^{10}$	$1:10^5$	4

Verstärkung der Barium-Ionen-Wirkung durch Acetylcholin.

Organ	Acetylcholin-Konzentrationen	Barium-Ionen-Konzentrationen	Anzahl der Versuche
Froschherz	$1:10^9 - 1:10^{15}$	$1:10^6 - 1:10^7$	über 10
Ureter des Hundes	$1:10^6$	$1:10^4$—$1:5\times10^4$	4

Atropin schwächt Barium-Ionen-Wirkung.

Organ	Atropin-Konzentrationen	Barium-Ionen-Konzentrationen	Anzahl der Versuche
Froschherz	$1:10^7$	$1:10^5 - 1:10^6$	2
Ileum der Ratte	$1:10^7$	$1:10^5$	über 10
Ureter des Hundes	$1:10^6$	$1:10^4$—$1:5\times10^4$	4

Zusammenfassung.

Es wird über Versuche an isolierten Organen mit Barium-Ionen in Konzentrationen berichtet, die den Muskeltonus im allgemeinen nicht beeinflussen.

Auf Organe mit Spontanbewegung wirken Barium-Ionen, ähnlich wie Azetylcholin, bewegungsauslösend und frequenzsteigernd, je nach dem augenblicklichen Funktionszustand des Organes.

Azetylcholin-Effekte werden durch vorhergehende Bariumchlorid-Gaben verstärkt und umgekehrt. Es besteht zwischen diesen beiden Substanzen ein synergistisches Verhalten.

Atropin hemmt an einigen Organen den Barium-Ionen-Effekt.

Es wird die Vermutung ausgesprochen, daß die Barium-Ionen fördernd auf die Cholinazetylase oder hemmend auf die Cholinesterase wirken.

Literatur.

[1] Zusammenfassung in Heffters Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. **3/1**, S. 250. Berlin: Springer 1927. — [2] Braun, M.: Arch. f. exper. Path. **94**, 222 (1922). — [3] Florkin, M.: Arch. internat. Physiol. **30**, 148 (1929), zit. nach Ber. Physiol. **47**, 553 (1929). — [4] Rentz, E.: Arch. f. exper. Path. **142**, 111 (1929). — [5] Raymond-Hamet: Arch. internat. Pharmacodynamie **43**, 386 (1932). Zit. nach Ber. Physiol. **72**, 382 (1933). — [6] Führer, H.: Arch. f. exper. Path. **88**, 178 (1916). — [7] Führer, H.: Arch. f. exper. Path. **119**, 56 (1926). — [8] Roth, G.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Physiol. **20**, 43 (1922). Zit. nach Ber. Physiol. **17**, 258 (1923). — [9] Gohara, A.: Acta Scholae med. Kioto **4**, 267 (1921). Zit. nach Ber. Physiol. **17**, 100 (1923). — [10] Weger, P.: C. r. Soc. Biol. Paris **96**, 799 (1927). Zit. nach Ber. Physiol. **41**, 287 (1927). — [11] Russo, G.: Boll. Soc. Biol. sper. **3**, 956 (1929). Zit nach. Ber. Physiol. **50**, 42 (1929). — [12] Scaffidi, V.: Riv. Pat. sper. **10**, 29 (1933). Zit. nach Ber. Physiol. **73**, 642 (1933). — [13] Chistoni, A.: Boll. Soc. Biol. sper. **5**, 786 (1930). Zit. nach Ber. Physiol. **59**, 818 (1931). — [14] Baur, M.: Arch. f. exper. Path. **112**, 22, 205 (1926). — [15] Stavraki, G. W.: J. of Pharmacol. **54**, 53 (1932). — [16] Inoue, H.: Acta Scholae med. Kioto **5**, 339 (1923). Zit. nach Ber. Physiol. **28**, 251 (1924). — [17] Raymond-Hamet: C. r. Soc. Biol. Paris **135**, 195 (1941). Zit. nach Ber. Physiol. **127**, 419 (1942). — [18] Bülbring, E., and J. H. Burn: Nature (Lond.) **136**, 172 (1949). — [19] Burn, J. H., and J. R. Vane: J. of Physiol. **108**, 104 (1949). — [20] Nachmansohn, D.: Nature (Lond.) **145**, 513 (1940). Zit. nach Lévy J., J. of Physiol. **39**, 413 (1947). — [21] Frommel, Herchberg and Picquet: Zit. nach Lévy J., J. of Physiol. **39**, 413 (1947). — [22] Feldberg, W., and C. Hebb: J. of Physiol. **106**, 8 (1947).

Heinz Lüllmann, (22b) Mainz, Pharmakol. Institut.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 119—136 (1950).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen.

Über die Eignung des Insektizids Hexachlorcyklohexan als Oxyurenmittel.

Von

L. Lendle und H.-H. Schneider.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 26. September 1949.)

Bei der Verwandtschaft im Bau des Nervensystems von Insekten und verschiedenen als Darmparasiten beim Menschen vorkommenden Wurmarten und bei den ähnlichen Aufnahmebedingungen durch die äußere Chitinhülle bei einiger dieser Tierarten war der Gedanke naheliegend, auch ein modernes Kontakt-Insektizid bei Wurmerkrankungen von Mensch und Tier zu verwenden. Eine solche Möglichkeit ist schon vor einigen Jahren mit den Wirkstoffen von Pyrethrumarten („Campiol" Promonta) verwirklicht worden. Jores und Wolter[1] haben experimentell nachgewiesen, daß diese Pyrethrine, die bei intravenöser Injektion hochgiftige Stoffe für den Warmblüter darstellen (6—8 mg/kg tödlich), bei enteraler Verabreichung ganz ungiftig sind, weil sie nur zu sehr geringen Teil resorbiert werden. Als „Muskelgifte" sollen diese Pyrethrine auch Oxyuren schädigen.

Als ein weiteres kontaktwirksames Mittel gegen Oxyuren und Askariden wurde neuestens „Contaverm" (Heumann) empfohlen. Als sein wirksamer Inhaltsstoff wird 2, 3, 5, 6-Dibenzothiazin genannt. In einer neuesten Mitteilung von Hänel und Weiss (Dtsch. med. Wschr. 1949, S. 745) werden genauere Angaben über diesen Stoff gemacht. Dabei handelt es sich wohl um das in Amerika[2] viel als Insektizid geprüfte Phenothiazin (Thiodiphenylamin). Es ist ein dem Thionin verwandtes Mittel, welches innerlich gegeben trotz Resorptionsfähigkeit relativ ungiftig ist, weil es im Organismus oxydativ verändert und schnell im Harn ausgeschieden werden kann. Besonders in der Tierheilkunde wird es vielfach als Oxyurenmittel und Harndesinfizienz verwendet[3].

Wir erhielten im Februar 1949 von der Hersteller-Firma *Jade*-Chemie, Wilhelmshaven und Hamburg ein neues Wurmmittel („Hexaverm") zur Prüfung, dessen Wirksamkeit gegen Oxyuren im Allgemeinen Krankenhaus Barmbeck von Oberarzt Dr. Eggers[4] schon erprobt war*. Nach Angabe der Herstellerfirma besteht das Präparat aus einem technischen

* Inzwischen ist auch von K. Graeve und G. Herrnring (Klin. Wschr. 1949,318, kurze Mitt.) eine Mitteilung über das HCC als Anthelminthikum veröffentlicht worden, auf deren Ergebnisse wir im folgenden eingehen werden.

Hexachlorzyklohexan („HCC"). Es handelt sich um ein modernes Insektizid, das ähnlich wie DDT wegen seiner schlechten Löslichkeit für den Organismus des Warmblüters sehr wenig giftig wirkt, aber durch die Chitinhülle von Insekten dringt und als sogenanntes „Nervengift" in sehr kleinen Mengen tödlich wirkt.

Über das HCC als Insektizid liegen in der deutschen Literatur noch wenig Veröffentlichungen vor, obwohl es in seinem Wert gegenüber dem bekannteren DDT mit besonderer Eignung als Pflanzenschutzmittel sogar gewisse Vorzüge besitzt. Eine chemische Beschreibung findet sich bei Haury[5]. Angaben über die Toxizität am Warmblüter machten besonders Taylor[6], Philippot und Dallemagne[7] sowie McNamara u. Mitarb.[8]. In einer neuesten Zusammenstellung von Velbinger[9] über verschiedene Insektizide findet sich eine sorgfältige Literaturverarbeitung mit eigenen Erfahrungen. HCC kommt im technisch synthetischen Produkt als Gemisch isomerer Verbindungen vor, von welchen 4 bekannt sind. Die wirksamste Verbindung ist die γ-Fraktion, auch als „Gammexan" bezeichnet, die bei Insekten 10fach wirksamer sein soll, als die 3 übrigen reinen Fraktionen bzw. das technische Produkt selbst.

Für die Beurteilung des neuen Wurmmittels „Hexaverm" welches nach Angabe der Herstellerfirma 12—13% γ-Fraktion enthält, war es neben einer Prüfung seiner Wurmwirksamkeit vor allem notwendig, seine Toxizität tierexperimentell zu prüfen. Dabei war, wie bei allen Wurmmitteln, auch die Frage der Resorbierbarkeit aus verschiedenen Lösungsmitteln zu beachten. Es ist bekannt, daß vorwiegend lipoidlösliche Stoffe, wie Tetrachlorkohlenstoff, der auch in der Behandlung der Hakenwurmerkrankung Verwendung findet, nicht gleichzeitig mit Alkohol oder fetten Speisen verabreicht werden sollen, um nicht die Resorptionsbedingungen der Stoffe infolge besserer Emulsionsbildung oder vermittels solcher „Schlittenstoffe" zu erhöhen. Für Extr. Filicis und andere moderne Wurmmittel wird freilich entgegen früherer Auffassung heute meist angenommen, daß ihre resorptive Toxizität durch gleichzeitige Verwendung von Rizinusöl vermindert werden kann (Oelkers[16]). Andererseits war uns aus zufälligen eigenen Erfahrungen über die Toxizität von DDT bei peroraler Aufnahme in öliger Lösung bekannt, daß es dabei eine größere Toxizität besitzen kann. Als weiterer Gesichtspunkt wurde bei der Prüfung die Frage der kumulativen Wirkung bei wiederholten Gaben beobachtet. Die Wurmwirksamkeit wurde an verschiedenen Objekten geprüft. Dabei wurde versucht, den Wirkungsmechanismus zu deuten.

I. Wirksamkeit an einigen Wurmarten.

Zur Prüfung der Wurmwirksamkeit bedient man sich vielfach an Stelle der speziellen Darmparasiten des Menschen verschiedener Wurmarten, die leichter zugänglich sind und auch besser eine Analyse der Wirkungsbedingungen gestatten. Im allgemeinen gelten wurmabtreibende Mittel teils als muskellähmende Stoffe (Extr. Filicis), teils als erregende Stoffe

(z. B. Santonin). In Versuchen in vitro gelingt es auch, bei genügender Einwirkungsdauer abtötende Konzentrationen zu ermitteln, während bei den Wurmkuren am Mensch und Tier die Darmparasiten meist noch lebend abgetrieben werden.

Insbesondere Oelkers u. Mitarb.[10] haben sich bemüht, für verschiedene Wurmarten die wirksamen Konzentrationen vergleichend zu ermitteln und unter Bezugnahme auf die am Warmblüter tödlichen oder toxischen Gaben auch ein Maß für die therapeutische Wirkungsbreite zu gewinnen. Eichholtz[11] und Ehrhardt[12] haben freilich darauf hingewiesen, daß die Wirkungsbreite eigentlich an der betreffenden Tierart für den speziellen Darmparasiten, der auch bei dieser Tierart vorkommt, bestimmt werden muß. Ferner hat Ehrhardt in mehreren, sehr kritischen Arbeiten auch die Notwendigkeit bewiesen, die Wurmmittel unter Berücksichtigung der biologischen Lebensbedingungen der Parasiten zu beurteilen. Insbesondere weiß man jetzt, daß die Oxyuriasis des menschlichen Organismus von selbst abheilt, wenn nicht eine Reinfektion stattfindet, so daß vielleicht bei dieser Wurmkrankheit hygienische Maßnahmen noch wichtiger sind als die Verabreichung von Wurmmitteln, die oft nur einen Erfolg vortäuschen. Ehrhardt und Gieser[14] haben eine spezielle Prüfungsmethode gerade für die Prüfung von Oxyurenmitteln am Kaninchen ausgearbeitet. Eine Prüfung mit diesem Verfahren ist für das Hexaverm noch in Aussicht genommen.

Vorerst wurden nur die Wirkungsgrenzen an einigen Wurmarten (Regenwurm, Schweineaskariden und Enchyträen) ermittelt im Vergleich zu dem von Oelkers bei anderen Mitteln gewonnenen Werten. Die verschiedenen Würmer wurden zu mehreren Exemplaren in steigende Konzentrationen von HCC gebracht, und 48 Std oder auch länger beobachtet. Einzelheiten über diese Ergebnisse finden sich in einer Dissertation von Bettner[15]. Ferner wurde HCC auch am isolierten Muskel und Nervmuskelpräparat von Regenwürmern und Blutegel geprüft, um eine Analyse des Wirkungsangriffspunktes durchführen zu können (vgl. Teil II). Aus diesen zahlreichen Versuchen seien hier nur die wirksamen Grenzkonzentrationen für das technische HCC-Präparat herausgestellt, zusammen mit den entsprechenden Grenzwerten anderer bewährter Wurmmittel, wie sie aus einer noch umfangreicheren Tabelle von Oelkers[16] entnommen werden konnten.

Tabelle 1. *Wirksame Grenzkonzentrationen verschiedener Wurmmittel an verschiedenen Wurmarten in mg%.*

Mittel	Intaktes Tier			Muskelpräp.		
	Enchytr.	Regenwurm	Ascarid.	Regenw.	Blutegel m. Gangl.	Blutegel ohne Gangl.
Thymol	4,0	6,0	12	0,1	0,6	1,0
Filmaron . . .	2,0	10,0	50	6,0	2,0	lähm.
Santonin	>20,0	>20,0	>20,0	0,2—5,0	22,5	20,0
Ascaridol	5,0	7,0	4,0	3,0	5,0	8,0
CCl_4	15,0	25,0	80,0	5,0	10,0	50,0
Pyrethrum . . .	10,0	—	>200,0	5,0	35,0	—
HCC	5,0	5,0	>50,0 ?	5,0	1,0	4,0
Lubisan	30,0	35,0	50,0	6,0	10,0	—

Als Ergebnis kann aus dieser Zusammenstellung gelesen werden, *daß HCC eine deutliche Wurmwirksamkeit besitzt, die in der Größenordnung liegt, wie sie für andere Stoffe auch gefunden wurde.*

In Kontrollversuchen mit γ-Reinfraktion* wurde an den genannten Wurmpräparaten *keine stärkere Wirksamkeit* gefunden als mit dem technischen Präparat (vgl. Bettner und Ergebnisse in Teil II). In der vorstehenden Tabelle ist besonders auffallend die fehlende Wirksamkeit des Präparates HCC bei Schweineaskariden. Es ergab sich nämlich trotz 24 bis 48stündiger Beobachtung in Emulsionen bis 1 : 2000 mit einem Alkoholgehalt von 5% keine abtötende Wirksamkeit. Diese Feststellung steht in deutlichem Widerspruch zu den Angaben von Graeve und Herrnring, die an Pferdeaskariden abtötende Wirkungen schon in 2—3 Std mit 0,3 mg% γ-HCC beobachteten, also mit Verdünnungen von 1 : 300000. Es muß abgewartet werden, ob wirklich positive klinische Erfahrungen auch eine Askaridenwirksamkeit beweisen. Möglicherweise ist die Unwirksamkeit des HCC bei Askariden bedingt durch ihr stärkeres äußeres Integument, bei dem nach Flury Keratin eine Rolle spielt.

II. Analyse der Wirkung von HCC auf Muskelstreifen von Regenwurm und Blutegel.

(Unter Mitarbeit von Dr. H. Kaller.)

Zur Analyse der Wirkung von HCC auf Würmer wurde das Regenwurmpräparat nach Trendelenburg[17] in 62 Versuchen und das Blutegelpräparat nach Führer[18] (ganglienfrei) in 10 Versuchen und nach Brücke und Sarcander[19], (ganglienhaltig) in weiteren 10 Versuchen verwendet. Das Muskelstück wurde jeweils in einem Glasgefäß, wie es für die Prüfung von Darmpräparaten gebräuchlich ist, aufgehängt. Da das HCC nicht wasserlöslich ist, mußte es in Form einer Emulsion gegeben werden, die folgendermaßen bereitet wurde: Die 1%ige Stammlösung von HCC in Methylalkohol wurde mit 3%igem Adhaegon der Fa. *Heyden* 1 : 10 verdünnt. Von dieser 0,1%igen Emulsion wurden soviel cm³ der Badeflüssigkeit (Froschringer) zugesetzt, daß die gewünschte wirksame Endkonzentration erreicht wurde. Nur diese ist in der folgenden Darstellung angegeben. Die Beobachtungsdauer betrug im allgemeinen 20 min, bei einigen Versuchen auch 60 min. Zur Kontrolle wurden mehrere Leerversuche (ohne HCC) durchgeführt.

A. Versuche am Regenwurmpräparat.

Am *ganglienhaltigen Regenwurm* bewirkt technisches HCC 1 : 50000 einen schnellen Tonusanstieg und vermehrte Bewegungen, die bald nachlassen, aber einem erneuten, jedoch weniger raschen und ausgiebigen Tonusanstieg mit Bewegungsvermehrungen Platz machen, der nach 10—20 min über Tonusverlust in Lähmung übergeht. Nach weiteren 5—10 min Lähmung setzen einzelne Spontanbewegungen ein, die während der ganzen Beobachtungszeit (bis zu 2 Std) bestehen bleiben (siehe Abb. 1a).

* Der Fa. *Merck*, Darmstadt danken wir für die freundliche Überlassung der reinen γ-Fraktion zu den Kontrollversuchen in dieser Arbeit.

Abb. 1a. Regenwurmpräparat mit Ganglienkette. Markierung: Zusatz von technischem HCC in Endkonzentration 1 : 20000.

Abb. 1b. Präparat ohne Ganglienkette. HCC wie bei 1a.

Am *ganglienfreien Präparat* des Regenwurms fehlt der primäre Tonusanstieg nach HCC, jedoch findet nach einer Latenzzeit von etwa 2 min eine langsame Tonuserhöhung mit Auftreten von Bewegungen statt, die durchaus der 2. Phase am ganglienhaltigen Präparat entsprechen. Auch dieser erhöhte Tonus sinkt nach etwa 10 min zur Norm ab und es entsteht eine, allerdings kurzdauernde Lähmung, die von geringgradigen Spontanbewegungen abgelöst wird (siehe Abb. 1b). Entfernt man während der HCC-Einwirkung die Ganglienkette, so zeigt das Muskelstück sofort die entsprechenden Abläufe des ganglienfreien Streifens, d. h. das Herauslösen sofort nach der HCC-Gabe bewirkt schlagartiges Unterbrechen des primären Tonusanstieges und Aufhören des Bewegungssturmes. Vielmehr tritt nur der langsamere Tonusanstieg wie bei ganglienfreien Präparaten auf. Daraus darf wohl geschlossen werden, daß *das HCC zunächst die Ganglienkette erregt*, die mit plötzlichem Tonusanstieg und Bewegungsvermehrung antwortet. Offenbar werden aber diese Ganglien bald gelähmt (Aufhören der Bewegung, Tonusabnahme). Inzwischen findet eine langsame beginnende Erregung der Muskulatur oder der trotz Abpräparierens der Ganglien in der Muskulatur verbliebenen Nervenendigungen statt, die mit Automatismen antworten. Schließlich werden auch diese peripheren Organe gelähmt. Nach langer Spülung mit Ringerlösung war die HCC-Wirkung reversibel, wenn die Vergiftung noch nicht bis zur Lähmung fortgeschritten war. Die erregende Wirkung von HCC tritt also anders als die des Santonins am gleichen Präparat zunächst mehr an den ganglionären Elementen in Erscheinung. Entgegen der nur erregenden Wirkung des Santonins am Muskel bzw. des Nerven, tritt dann später auch eine muskulärlähmende Wirkung auf. Quantitativ liegt die Wirksamkeit des Santonins nach Trendelenburg[17] etwa in der gleichen Größenordnung (1 : 16000).

B. Versuche am Blutegel.

Noch deutlicher als beim Regenwurm tritt der zweifache Angriffspunkt des HCC am Ganglienapparat und der Muskulatur bzw. den feinsten Nervenendigungen am Blutegelpräparat hervor. Am *ganglienhaltigen* Blutegel bewirken bereits Konzentrationen 1 : 250000 bis 1 : 125000 Auftreten von großen Spontanbewegungen ohne Tonuserhöhung, die bei HCC-Lösungen von 1 : 50000—1 : 10000 von kleineren, schnelleren Bewegungen überlagert werden, während die großen, langsamen Bewegungen kleiner werden. Am *ganglienfreien* Stück dagegen bewirken erst Konzentrationen von 1 : 30000—1 : 20000 Tonusanstieg und kleine frequente Spontanbewegungen: Es werden also erst dann Bewegungsautomatismen ausgelöst, die übrigens am normalen ganglienfreien Stück nie beobachtet werden.

C. Versuche nach Nikotinvorbehandlung.

Als Beweis dafür dürfen auch Versuche mit Nikotinvorbehandlung gelten: Am Regenwurm wurde mit Nikotin 1 : 1000000—1 : 150000 die Ganglienkette ausgeschaltet, was am Aufhören der Spontanmotorik erkennbar war. Wurde nun HCC in der üblichen, sicher wirksamen Konzentration (1 : 20000) gegeben, erfolgte ein langsamer Tonusanstieg mit dem für das ganglienfreie Präparat typischen Ingangkommen der Spontanmotorik. Am Blutegel war die erforderliche Nikotinkonzentration 1 : 100000. Anschließende Gabe von HCC wirkte am ganglienhaltigen Präparat wie am ganglienfreien nicht mit Nikotin vorbehandelten Muskel.

D. Vergleich von technischem HCC und der γ-Fraktion.

Von besonderem Interesse schien die Wirkung des reinen γ-Isomers des HCC zu sein, da wegen der hohen Giftigkeit gegenüber Warmblütern und Insekten auch eine andere Wirkung auf die Regenwurmmuskulatur denkbar war. Während das technische Gemisch-HCC eine, wie eben geschildert, fest umrissene typische Wirkungsweise zeigt, ist das Verhalten bei γ-HCC nicht einheitlich.

Am ganglienhaltigen Regenwurmpräparat vermißt man den primären starken Tonusanstieg und eine klare Wirkung auf die Spontanmotorik. Es erfolgt ganz verschieden eine Bewegungszu- oder -abnahme. Die untere Grenzdosis liegt zwar bei 1 : 100000 (also die Hälfte der für das technische HCC wirksamen Konzentration), aber selbst bei 1 : 10000 γ-HCC findet sich keine so typische Wirkung. Dieses uneinheitliche Verhalten erklärt sich vielleicht daraus, daß γ-HCC noch viel schlechter löslich ist als das technische Produkt und daß die Aufnahme aus der Umgebung entsprechend dem Verteilungsgrad erfolgt.

E. Antagonistisches Verhalten biologisch wichtiger Stoffe.

In der Absicht, möglicherweise den chemischen Angriffspunkt des HCC festzustellen, wurden am ganglienhaltigen Regenwurm als Testobjekt eine ganze Reihe von Verbindungen geprüft, die durch ihren chemischen Aufbau eine Reaktion mit HCC und dadurch eine Beeinflussung seiner Wirkung erwarten ließen. Dafür wurde das Antidot 10 min in die Badeflüssigkeit des Regenwurmstreifens gebracht. Zu gleicher Zeit wurde der betreffende Stoff mit HCC-Emulsion in einem Becherglas gemischt, so daß beide Substanzen aufeinander einwirken und eventuell chemische Umsetzungen stattfinden konnten. Nach 10 min wurde in der Badeflüssigkeit die reine Antidotlösung gegen die Lösung Antidot + HCC ausgetauscht. Folgende Medikamente wurden in den

Konzentrationen geprüft, die für sich allein gerade keine wesentliche Beeinflussung der Bewegungen des Muskelstreifens machten:

Boviserin	1 : 40	Thioharnstoff	1 : 100
Magnes. chlorid	1 : 500	Piperazin	1 : 5000
Novokain	1 : 1000	Hexamthylentetramin	1 : 100
Urethan	1 : 350	Glyzerin	1 : 25
Curare*	1 : 600	Formamid	1 : 60
Cystein	1 : 2500	Cholesterin	1 : 10 000
Glykokoll	1 : 1000	Lezithin	1 : 20 000
Natriumthiosulf.	1 : 350		

Keiner dieser Stoffe hob die HCC-Wirkung am Regenwurm auf. Lediglich bei Verwendung von Dextrose 1 : 40 als Badeflüssigkeit für den Muskelstreifen wurde eine rund 1½ mal stärkere Konzentration von HCC zur Erzielung gleicher Wirkungen gebraucht. Doch ist dabei nicht sicher zu unterscheiden, ob nicht die Dextroseeigenwirkung, die bei diesen hohen Konzentrationen auftritt, diese Veränderung bewirkt.

III. Beeinflussung der Kaliumkontraktur an der Skelettmuskulatur.

Von Bacq und Mitarbeitern[22] sind für eine Anzahl von Muskelgiften Beobachtungen über eine Beeinflussung des Ablaufs der Kaliumkontraktur gemacht worden. Mit Veratrin, Aconitin u. a. gelang es, eine Sensibilisierung zu erzielen, so daß größere Kontraktionen erreicht wurden, die auch langsamer wieder beim Auswaschen abklangen. Diese Feststellung bringt Bacq in Zusammenhang mit einer Hemmung in der Entionisierung des den Erregungsvorgang auslösenden ionisierten Kaliums. Die tiefere Ursache vermutet er in der Hemmung eines dafür verantwortlichen Fermentes. In Versuchen mit verschiedenen Muskelstoffwechselgiften wie Monobromessigsäure und verwandten „blasenziehenden" Stoffen, welche Sulfhydrilgruppen blockieren und damit physiologische Fermentreaktionen ausschalten können, beobachtete er dagegen nach Kaliumgaben ohne eintretende Sensibilisierung eine wesentliche Abschwächung der Erholung, so daß die Muskeln in zunehmender Kontrakturstellung weniger auf Kaliumreize ansprachen. Dieses Verhalten führt Bacq[23] auf die von Lundsgaard beschriebene Hemmung der Milchsäurebildung im Muskel zurück. L. hatte demgemäß bei elektrisch gereizten Muskeln unter Halogenessigsäureeinwirkung das von Bacq für Kalium beschriebene Verhalten festgestellt.

Wir prüften für das HCC, ob es ähnliche Wirkungen im Sinne des Bacq- oder Lundsgaard-Effektes auszuüben vermag. In früheren Versuchen von Hoffmann und Lendle[25] waren mit DDT, welches am Regenwurm keine Erregungen oder Kontrakturen in Konzentrationen bis 1 : 1000 ausgelöst hatte, keine Muskelwirkung im obigen Sinne bis zu

* Sammlungspräparat mit einem Froschwert von 0,01 mg/10 g Frosch.

Konzentrationen von 1 : 1000 beobachtet wurden. Methodisch gingen wir so vor, daß wir am Rectus abdominis von Rana Temporaria aber auch von Esculenten zunächst die Konzentration für eine konstante deutliche Kaliumkontraktion, die gewöhnlich bei 1 : 800—1 : 600 lag, ermittelten und nach dieser Einstellung HCC 10 min lang einwirken ließen. Danach wurde der Kaliumeffekt unter dieser Gifteinwirkung geprüft. Es ergab sich, daß bei Konzentrationen von 1 : 20000—1 : 10000 Sensibilisierung für Kaliumionen deutlich wurden. Dabei war auch meistens eine Verzögerung der Erholung beim Auswaschen zu beobachten. Das Bild entsprach also mehr dem Bacq-Effekt nach Veratrin als dem Lundsgaard-Effekt nach Halogenessigsäure. Höhere Konzentrationen von HCC verstärkten die Kaliumwirkung so sehr, daß auch nach 30—50 min dauernder Spülung die Kontraktion nur unvollständig verschwand (siehe Abb. 2). Eigene Kontraktureffekte zeigte HCC auch in Konzentrationen von 1 : 5000 nicht. Kontrollversuche mit der reinen γ-Fraktion ergab keine qualitativ oder quantitativ abweichendes Verhalten.

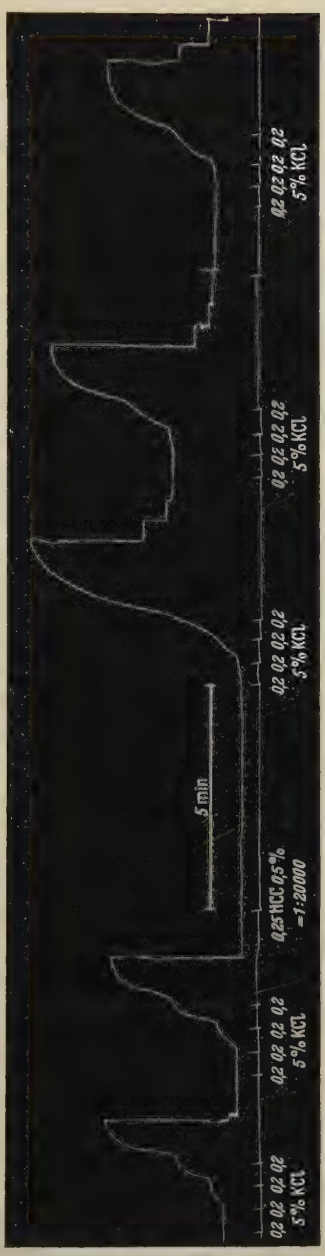


Abb. 2. Isolierter Froschrektus in Ringerlösung (25 cm³) Zusatz von 5%igem KCl in Einzelgaben, mit gleichem zeitlichem Abstand. Nach 4mal 0,2 cm³ wurde in der Lösung eine Endkonzentration von 1 : 625 erreicht. Nach Spülung mit Ringerlösung Registrierung alle 5 min (treppenförmige Absätze). Markierung: Zusatz von tech. HCC in Endkonzentration 1 : 20000 wirkte 5 min vor Prüfung des KCl-Effektes ein.

Diese Befunde scheinen uns von besonderer Bedeutung, weil sie auf die Möglichkeit eines Angriffspunktes des HCC an Stoffwechselfermenten hinweisen, die vielleicht auch für die wurmtreibende Wirkung von Bedeutung sein könnten. Es ist nämlich auffallend, daß die wurmschädigenden Konzentrationen (1 : 20000) etwa gleich groß sind wie die hier als kontraktionsfördernd gefundenen. Ferner sei betont, daß wir dieselbe

Verstärkung der Kaliumwirkung im gleichen Dosierungsbereich auch an der Blutegelmuskulatur beobachteten.

Demgegenüber besitzt das DDT, wie schon erwähnt, weder eine wurmschädigende noch eine kaliumkontrakturfördernde Wirkung bei Prüfung mit Konzentrationen bis 1 : 1000. Die letzte Angabe ist freilich insofern erstaunlich, als eine gewisse chemische Verwandtschaft der Verbindungen besteht. Vielleicht läßt sich das negative Verhalten von DDT auf seine geringe Löslichkeit zurückführen.

Anmerkung: Der zuletzt aufgenommene Gedanke veranlaßte uns, weitere bekannte Wurmmittel auf den Bacq- und Lundsgaard-Effekt zu prüfen. *Santonin* 1 : 50000 bis 1 : 10000 zeigte eine Abschwächung der Kaliumkontraktur, jedoch mit deutlich verzögerter Erholung. *Oleum Chenopodii* ließ bei Konzentrationen von 1 : 10000 bis 1 : 2000 die Kaliumkontraktur unbeeinflußt. In stärkerer Dosierung (1 :1000 bis 1 : 200) wurde bei langsam ansteigendem Tonus die Kaliumerregbarkeit abgeschwächt bzw. sogar aufgehoben. Als 3. geprüftes Wurmmittel zeigte *Oleum Filmaroni* in starker Verdünnung (1 : 500000 bis 1 : 50000) eine mäßige Kaliumkontraktionsförderung bei langsamer und unvollständiger Erholung. Mittelstarke Konzentrationen (1 : 20000 bis 1 : 10000) ergaben Tonuserhöhung bei kaliumsensibilisierender Wirkung und schlechter bzw. fehlender Erholungsfähigkeit. Starke Konzentrationen von Filmaronoel (1 : 2000) zeigten bereits Eigenkontraktur auch ohne Kaliumzusatz, sonst das gleiche Bild wie bei mittlerer Dosierung.

Aus diesen Versuchen ergibt sich deutlich, daß alle geprüften Mittel wohl auf den intermediären Kohlenhydratstoffwechsel wirken. Santonin und Oleum Chenopodii zeigen ein Verhalten gemäß dem Lundsgaard-Effekt, Oleum Filmaroni zusätzlich auch Kaliumsensibilisierung gemäß dem Bacq-Effekt. Der letzte Stoff scheint also dem HCC ähnlicher in seinem Verhalten, obwohl er im Gegensatz zu HCC *nur lähmend* wirkt. Wenn man jedoch die aus der Literatur bekannten wirksamen Konzentrationen der Mittel an Würmern, z. B. am Regenwurmmuskel vergleichend betrachtet, dann liegen die von uns gefundenen Konzentrationen für den Bacq-Effekt bei Santonin und Oleum Filmaroni sowie HCC im gleichen Bereich. Bei Oleum Chenopodii ist die Beeinflussung gemäß Lundsgaard-Effekt erst mit Konzentrationen ab 1 : 1000 zu erreichen, während Wurmwirksamkeit schon ab 1 :10000 und schwächer beobachtet wird. Die Parallele ist also nicht so vollkommen, daß daraus Schlüsse auf den Wirkungsmechanismus abgeleitet werden können. Dieser Gedankengang soll noch weiter verfolgt werden.

IV. Resorptiv-toxische Wirkungen bei peroraler HHC-Gabe an Ratten.

Zur Prüfung der Toxizität an Säugetieren wurde an Ratten und Hunden per os HCC verabfolgt, um dabei Vergiftungsbild und Todesursache, sowie die Beeinflussung der Resorption bei Verwendung von verschiedenen Lösungsmitteln, die eventuelle Kumulation und die Ausscheidungsverhältnisse zu studieren.

Für die Versuche fanden Ratten im Gewicht von 120—170 g Verwendung, die im eigenen Tierstall längere Zeit beobachtet waren. Das HCC wurde 5%ig in Lösungsmitteln mit einer leicht gebogenen stumpfen Metallkanüle in abgemessenen Mengen bis zu 5 cm^3 in den Magen gegeben. Starben die Tiere während des Versuches, wurde stets die Sektion durchgeführt. In seltenen Fällen, bei denen sich ein Anhaltspunkt für eine Ösophagusverletzung durch die Sondierung ergab, wurde dieser Ver-

such in die Statistik nicht aufgenommen. Blieben die Tiere aber am Leben, so wurden sie nur selten zu einem erneuten HCC-Versuch gebraucht, keinesfalls vor Ablauf einer symptomfreien Frist von 3 Wochen. Das HCC wurde, zunächst als technisches Produkt, in Lebertran, Rizinusöl und Paraffinöl verabfolgt, ferner zum Vergleich in einer Emulsion mit 3%igem Adhaegon in Wasser (siehe oben).

A. Vergiftungsbild.

Es seien hier zunächst die Vergiftungserscheinungen bei Verwendung von *technischem HCC* berichtet. Es muß grundsätzlich festgestellt werden, daß die ersten Vergiftungssymptome auffallend spät eintraten, auch bei Dosen, die oberhalb der tödlichen Grenze lagen. Erst nach 48—56 Std traten als erste Zeichen von Erregung im Zentralnervensystem ein spastischer Gang, Überempfindlichkeit bei Berühren (Piepen) und ein typisches, fast klonisches Zittern der Extremitäten bei Halten am Rattenschwanz auf. In diesem Zeitpunkt zeigten die Tiere noch Freßneigung. Auffallend war in diesem Stadium eine hellrote Färbung der unbehaarten Haut. Die genannten Symptome waren reversibel bei untertödlicher Dosierung.

Bei tödlichen Gaben folgten in einem sehr protrahierten Vergiftungsablauf weitere typische Erregungserscheinungen: Spastische Streckstellung der Hinterbeine im Sitzen (Känguruhhaltung), Ataxie, schwere klonische, nicht reflektorisch tetanische Krämpfe, später aufsteigende Lähmung, erregte Atmung. Diese Erscheinungen hielten mitunter tagelang an. Die Tiere kühlten stark aus, obwohl sie stets bei Zimmertemperatur (18—20°) gehalten wurden. Sie behielten aber die auffallend hellrote Hautfarbe bei. Es lag also keine Störung von Atmung und Kreislauf vor. Änderungen am Blutfarbstoff konnten nicht beobachtet werden. Der Tod trat frühestens nach 3—4 Tagen ein (Todesursache: Erschöpfung, Auskühlung und Atemlähmung). Dieses Vergiftungsbild kann nur im Sinne einer schweren zentral-nervösen Erregung in höheren Gebieten als im Rückenmark gedeutet werden. Es fehlt beispielsweise auch ein Symptom der Rückenmarkserregung, wie es im Mäuseschwanzphänomen nach Morphin von Straub[20] beschrieben wurde.

Vergiftungen mit reinem *γ-HCC* zeigten folgende Abweichungen: Die 1. Erscheinungen traten schon innerhalb von 4 Std, mitunter sogar schon nach 7—15 min auf. Der Tod erfolgte in der Grenzdosierung schon nach 3—20 Std. In dem schnelleren Ablauf der Vergiftung waren Krampferscheinungen in dem sonst ähnlichen Bild weniger ausgeprägt. Außerdem fiel jedoch auf, daß bei dieser Vergiftung die Tiere nicht die hellrote Hautfarbe aufzeigten, sondern früher in Zyanose fielen. Eine Erklärung dafür kann noch nicht gegeben werden.

Bei den *Sektionen* fand sich außer einer durch die terminale Seitenlage bedingte einseitige Hypostase in den Lungen, im Magen und den

oberen Dünndarmschlingen eine deutliche Hyperämie. Blutiger Dünndarminhalt wurde nur selten gefunden. Geschwürsbildung war im Nativpräparat bei auffallendem Licht mikroskopisch nie nachweisbar.

B. Toxische Grenzdosen in verschiedenen Lösungsmitteln.

Wie einleitend erwähnt wurde, war es notwendig, die Toxizität in verschiedenen fettartigen Lösungsmitteln zu prüfen. In der folgenden Tabelle ist nur ein Überblick über die Versuche zur Ermittlung der toxischen Grenzdosis gegeben. Zur Erklärung sei bemerkt, daß hier nur die Anzahl der tödlichen Fälle der bei den jeweiligen Dosen verwendeten Tiere angegeben ist (Mortalität).

Tabelle 2. *Mortalität von techn. HCC in Abhängigkeit von der Dosierung und dem Lösungsmittel peroral an Ratten.*

Dosis mg/kg	Rizinus	Lebertran	Paraffin	wäßrige Emulsion
600		1 von 6		0 von 1
800		2 von 4		0 von 2
1000	0 von 4	2 von 2	0 von 3	1 von 3
1200	1 von 3		2 von 3	0 von 3
1500	2 von 3			2 von 2

Als Ergebnis kann festgestellt werden, daß HCC gelöst in Rizinusöl und Emulsion am wenigsten toxisch ist (1500 mg/kg), während bei einer Lösung in Lebertran schon 800—1000 mg/kg tödlich wirken. Die Toxizität in Paraffinöl steht dazwischen. Nach dieser Feststellung ist die *Toxizität* des technischen HCC *bei einmaliger Gabe per os also nur gering* und es besteht keine große Gefahr, wenn HCC als Wurmmittel verwendet wird, auch nicht bei gleichzeitiger Gabe von Rizinusöl als Abführmittel. Fette wie Lebertran können die Toxizität zwar erhöhen, die Wirkungsbreite dürfte jedoch auch dann noch groß genug sein.

Tabelle 3. *Mortalität von Ratten bei peroraler Gabe von γ-HCC in Lebertran.*

Dosis mg/kg	Mortalität
20	0 von 1
40	0 von 2
100	2 von 4
200	3 von 5
300	2 von 2

Gleichartige Versuche mit dem γ-HCC, gelöst in Lebertran, ergaben eine wesentlich geringere tödliche Dosierung von 100—200 mg/kg. *Die γ-Fraktion wirkte danach also etwa 5—10 mal stärker toxisch als das technische Gemisch.*

Diese Feststellung ist bedeutsam, weil in der vorausgegangenen Darstellung gerade an verschiedenen Wurmpräparaten, aber auch am

Bacq-Effekt ein quantitativer Unterschied im Verhalten des technischen Produktes und der reinen γ-Fraktion nicht gefunden worden war. Praktisch könnte diese Tatsache bedeuten, daß das technische Produkt also als Wurmmittel eine größere Wirkungsbreite besitzt als die γ-isomere Verbindung.

C. Kumulation bei wiederholten Gaben.

Bei einem so lang anhaltend wirkenden Gift besteht die Gefahr, daß wiederholte Gaben sich addieren und eine zum mindesten dynamische, wenn nicht gar chemische Anreicherung der Substanz bewirken. Da Wurmmittel bei Oxyuriasis häufiger gegeben werden und die Herstellerfirma auch eine mehrtägige Kur empfiehlt, war es wichtig, auch die Frage einer Kumulation zu prüfen. Für Oleum Chenopodii bzw. Askaridol und dem Wirkungsstoff von Extr. Filicis muß wohl bei protrahierten Gaben mit einer Kumulation gerechnet werden. In klinischen Arbeiten und Arzneimittelverordnungen wird freilich mehr die Resorptionssteigerung durch Reizung des Darmes für eine eventuelle Vergiftung bei wiederholten Gaben verantwortlich gemacht (Straub[21]).

Unsere Dauerversuche wurden folgendermaßen durchgeführt: Die Ratten erhielten bis zu 6mal an aufeinanderfolgenden Tagen eine Dosis, die 25—50% der letalen betrug. Als tödliche Dosis wurde 1000 mg/kg zugrunde gelegt. Sobald sich motorische Erscheinungen zeigten, wurde HCC nicht mehr weiter gegeben. Tab. 4 zeigt das Ergebnis, gegliedert nach der Höhe der verabfolgten Einzeldosis. Auch in dieser Zusammenstellung ist unter Mortalität das Verhältnis der Anzahl von gestorbenen zu der im Versuch angesetzten Tiere eingetragen.

Tabelle 4. *Mortalität von Ratten bei wiederholter Gabe von unterschwelligen Dosen techn. HCC in Lebertran.*

Einzeldosis in % der let. Dos.	Wiederholungen	Gesamtdosis in % der let. Dos.	Mortalität
20%	6mal	120%	1 von 7
25%	3—6mal	75—150%	4 von 7
30%	2—5mal	60—150%	6 von 7
40%	3mal	120%	2 von 2
50%	3mal	150%	2 von 2

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß ein Fünftel der Letaldosis 6mal gegeben vertragen wird. *Liegt die Einzelgabe jedoch über 25%, zeigt sich eine deutliche Kumulation,* die zwar nicht überadditiv, aber doch so weit ausgeprägt ist, daß summierte Einzelgaben ohne großen Verlust wirken, obwohl sie auf 5—6 Tage verzettelt sind.

D. Akute Versuche bei intraperitonealer HCC-Gabe.

In der Absicht, akut verlaufende Vergiftungen zu erzielen, die die Möglichkeit bieten sollten, Antidotversuche anzustellen, erhielten Ratten intraperitoneal HCC in Lebertran gelöst bzw. als wäßrige Emulsion. Die letale Dosis lag nach 13 Ver-

suchen für technisches HCC bei 400 mg/kg und nach 10 Versuchen für γ-HCC bei 50 mg/kg. Das entspricht jeweils der halben peroralen, letalen Menge. Vergiftungsbild und Zeitverhältnisse bei intraperitonealer Verabreichung entsprachen den Erfahrungen bei der peroralen Gabe, mit der Abweichung, daß sowohl bei technischem HCC als auch der γ-Fraktion die Vergiftung etwas schneller verlief. Bei technischem HCC trat der Tod durchschnittlich auch erst nach 40 Std ein, während bei γ-HCC etwa 3 Std bis zum Tode vergingen. Nach diesen Befunden ist also die Resorption aus öliger Lösung bei intraperitonealer Zufuhr auch nicht groß.

E. Beurteilung der Toxizitätsverhältnisse.

Wenn wir unsere vorausgehend dargestellten Ergebnisse mit den Befunden anderer Autoren vergleichen, dann können einige allgemeine Beziehungen abgeleitet werden. McNamara und Krop fanden bei intravenöser Injektion 4 mg Gammexan gegenüber peroral 50—100 mg an Hunden und Kaninchen als tödliche Dosis. Bei der intravenösen Injektion eines Gemisches der Isomeren war die tödliche Dosis bis 40mal geringer, die Wirksamkeit der γ-Fraktion wurde also durch die anderen Isomeren mit zum Teil lähmenden Eigenschaften antagonistisch beeinflußt. Wir fanden für Ratten bei peroraler Zufuhr die γ-Fraktion etwa 8mal so wirksam als das technische Produkt mit 15% γ-Anteil. Es ließ sich also kein eigentlicher Antagonismus erkennen. Velbinger[9] fand noch geringere Unterschiede.

Bei peroraler Zufuhr ist HCC wesentlich schwächer wirksam als bei intravenöser Injektion, weil es langsam resorbiert wird, wie auch der langsame Eintritt der Wirkung beweist. Das reine γ-Präparat wird jedoch schneller resorbiert, auch in der wirksamen Grenzdosierung. Aus der langen Wirkungsdauer kann auf eine langsame Elimination und die Möglichkeit der *Kumulation* geschlossen werden.

Während Gräve und Herrnring dies nach ihren Versuchen an Mäusen trotz täglicher peroraler Gabe von 50% der tödlichen Einzeldosis ausdrücklich bestreiten, konnten wir an unseren Ratten mit täglichen Gaben ab 25% der tödlichen Dosierung, die selbst noch keine erkennbaren Vergiftungserscheinungen auslösten, eindeutig Kumulationseffekte nachweisen. Die Beobachtungen sprechen mehr für eine chemische Anreicherung des Stoffes auf Grund zu langsamer Elimination als für eine dynamische, funktionelle Kumulation.

Trotz dieser Kumulationsmöglichkeit ist die toxische Dosis, auf den Menschen berechnet im Vergleich zur erforderlichen therapeutischen Dosierung noch sehr hoch, so daß die *therapeutische Breite* als genügend zu bewerten ist. Sie liegt eher höher als bei anderen Wurmmitteln.

Freilich ist es eine mißliche Aufgabe, eine Wirkungsbreite für Wurmmittel nach Tierversuchen zu berechnen, da die Bedingungen der Wurmwirksamkeit ja nicht denen bei der therapeutischen Verwendung am Menschen entsprechen. Eichholtz, Ehrhardt u. Mitarb. haben solche Berechnungen angestellt, indem sie an der gleichen Tierart, wo sie die wurmtreibende Wirkung prüften, auch die Toxizität des

betreffenden Mittels feststellten. Sie kamen dabei (vgl. Zusammenstellung im Lehrbuch der Pharmakologie von Eichholtz 1947, S. 367) zu Werten, die in manchen Beziehungen doch zweifelhaft erscheinen. So wurde das Verhältnis der therapeutischen zur toxischen Dosis für Filmaronoel, Santonin und Ascaridol etwa 1 : 40, also sehr günstig, dagegen für das harmlose und viel verwendete Lubisan nur mit 1 : 3 angegeben. Die letztgenannte Zahl beruht vielleicht darauf, daß gerade die Abtreibung der oxyurenähnlichen Würmer am Kaninchen wegen ihres Aufenthaltes in dem großen Blinddarmsack dieser Tierart viel höhere Dosen als beim Menschen erfordert, obwohl andererseits nach Oelkers und Zessler[25] die Oxyuren des Menschen weniger empfindlich gegen Wurmmittel sind als die verwandte Art der Kaninchenoxyuren.

Wir haben solche Werte der therapeutischen Breite auf andere Weise aus den Zahlenangaben für wichtige Mittel bei Oelkers zu errechnen versucht. Als therapeutische Einzeldosis am Menschen entnahmen wir die üblichen Dosierungsangaben. Die tödliche Einzeldosis für den Menschen berechneten wir aus den experimentell ermittelten tödlichen Dosen an verschiedenen Tierarten und setzten dabei voraus, daß der Mensch nicht giftempfindlicher ist. Nicht berücksichtigt wurde bei dieser Berechnungsart die Möglichkeit einer kumulativen Giftwirkung.

Bei dieser Berechnungsart ergab sich, daß Filmaron, Askaridol, Lubisan und Thymol (nur für die Toxizität am Kaninchen berechnet, nicht aber für die Thymol-empfindlichere Katze) erst in Gaben von mehr als der 20—30fachen therapeutischen Einzeldosis tödlich wirkten. Die höchsten Werte (über 300fach) fanden wir für Santonin, Pyrethrum und HCC. Sie liegen unwahrscheinlich hoch, besonders für Santonin, und sind wohl weniger durch die geringe Giftigkeit als die hohe Wirksamkeit in kleinen Gaben (0,1) bedingt. Für das HCC wurde die therapeutische Breite bei praktischer Verwertung allerdings durch die Kumulation etwas vermindert.

V. Toxizität und Ausscheidung am Hund
(nach Versuchen von Bettner).

Um die Ausscheidungsbedingungen des HCC zu prüfen, stellten wir Versuche an 2 Hunden an, bei denen mehrere Tage lang, Kot und Harn in Tagesportionen getrennt aufgefangen wurden, beginnend 24 Std nach der Zufuhr.

Hund A (6 kg) erhielt eine einmalige Gabe von 50 mg technischem HCC pro kg in Wurst verrieben. Das Tier ließ keine Störungen in der Freßlust, im Körpergewicht und Allgemeinverhalten erkennen.

Hund B (6 kg) erhielt 6 Tage lang täglich 100 mg pro kg technisches HCC in Wurst. Er fraß zuletzt diese Zubereitung widerwillig und mußte am letzten Versuchstag die abgemessene Menge mit der Schlundsonde verabreicht bekommen. Nervöse Vergiftungserscheinungen traten nicht auf. Das Tier zeigte geringere Freßlust, am Ende der Zufuhrperiode war das Körpergewicht 7 kg, sank aber in den folgenden Tagen auf 5 kg, wobei die Abmagerung auch deutlich auffiel. Nach weiteren 4 Wochen war das Erstgewicht mit 7½ kg überschritten.

Um die Ausscheidung von HCC quantitativ zu erfassen, bedienten wir uns einer *biologischen Nachweismethode*, weil die kleinen Mengen chemisch nicht erfaßt werden konnten. Wir stellten in Vorversuchen in einem Fliegentest die wirksame Grenzkonzentration eines HCC-Filmes fest, indem wir je 0,5 cm³ HCC-Lösung (in Methanol oder Azeton) im Boden einer Petrischale verdunsteten und diese nach Einsetzen von 4 Fliegen mit einer Glasplatte bedeckten (vgl. Methodik bei Bettner).

Im Vorversuch ermittelten wir als tödliche Grenzkonzentration bei 48stündiger Einwirkungszeit

für technisches HCC .... 5mal 10^{-5}
für die γ-Fraktion ..... 3mal 10^{-6}.

Die γ-Fraktion war also etwa 15mal wirksamer. Da wir die Hunde mit technischem HCC gefüttert hatten, konnten wir als Grenze für den Nachweis unseres Präparates eine Menge von 0,025 mg annehmen. Bezogen auf die zugeführte Tagesgabe von 50—100 mg/kg, also etwa 300—600 mg war also noch ein 1/12000 davon nachzuweisen. Es bestand also Hoffnung auf positive Ergebnisse.

Die täglichen Harnmengen wurden in 5maliger fraktionierter Ausschüttelung mit je 200—100 cm³ Chloroform behandelt. Der Kot wurde zerstoßen in Chloroform mehrere Tage lang aufbewahrt und auch mehrfach nach Abgießen nachgespült. Die langsam abgetrennten Chloroform-Fraktionen wurden nach Vereinigung mit Natr. Sulfat getrocknet und das Chloroform auf dem Wasserbad langsam abgedunstet. Bei diesem Vorgehen war wohl mit gewissen Verlusten an HCC zu rechnen, da das HCC etwas flüchtig ist. Wir hofften aber, bei der Empfindlichkeit des biologischen Testes orientierende Ergebnisse zu erhalten. Die Rückstände wurden mit jeweils 5 cm³ Methanol oder Chloroform aufgenommen. Von diesen die etwaige Gesamtmenge enthaltenden Lösungen wurden im Fliegentest je 3,0, 1,5 und eventuell 0,5 cm³ geprüft.

Tabelle 5. *Gefundene HCC-Menge im Kot.*

Hund A	Am 1. Tag	0,25	mg
	„ 2. „	0,075	„
	„ 3. „	0,075	„
	„ 4. „	0,075	„
		0,48	mg
Hund B	Am 1. Tag	0,25	mg
	„ 2. „	0,18	„
	„ 3. „	0,05	„
	„ 4. „	0,025	„
	„ 5. „	—	
		0,505	mg

Im Harn konnte bei keinem Hund an den 4 bzw. 5 Tagen, beginnend 24 Std nach der letzten Zufuhr, eine Ausscheidung nachgewiesen werden. Dagegen ließen sich im Kot noch sehr geringe Mengen erfassen. Tab. 5 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Testierungen mit dem Kotextrakt. In dieser Tabelle sind die im Fliegentest gefundenen Mengen

(vgl. die zahlenmäßigen Angaben bei Bettner) kurz zusammengestellt. Danach wäre also schon 24 Std nach Zufuhr des Mittels dieses aus dem Kot verschwunden. Nur insgesamt 0,5 mg von etwa 300—600 mg konnten nachgewiesen werden. Die Ausscheidung sank schnell auf Werte an der Grenze des Nachweises, bei der Fehlermöglichkeiten die Ergebnisse unsicher machen.

Als Gesamtergebnis kann aus diesen 2 orientierenden Versuchen abgelesen werden, daß die bei peroraler Verabreichung nicht resorbierten Anteile von HCC schnell im Kot ausgeschieden werden (praktisch in 24 Std) und daß der resorbierte Anteil nach der Aufnahme praktisch nicht in wirksamer Form im Harn erscheint.

Zusammenfassung.

Das Kontaktinsektizid HCC wurde in Form seines technischen Isomerengemisches im Vergleich zu der reinen γ-Fraktion auf Wurmwirksamkeit und allgemeine Toxizität am Warmblüter unter verschiedenen Verabreichungsbedingungen geprüft.

An niederen Wurmarten (Regenwurm, Blutegel und Enchyträen) erwies sich HCC als schädigend in einer Größenanordnung, wie sie auch für andere Wurmmittel festgestellt worden ist. Nur Askariden wurden in Konzentration von 1 : 1000 nicht wesentlich geschädigt. Die Analyse am ganglienhaltigen sowie am ganglienfreien Regenwurm- und Blutegelpräparat ergab, daß HCC vorwiegend erregend auf die Ganglienkette, aber auch auf den Muskelstreifen selbst einwirkt. Diese unter Tonusanstieg verlaufende Erregung schlägt allmählich in Lähmung um. Bei Zusatz chemisch definierter physiologisch aktiver Verbindungen ließ sich keine antagonistische Wirkung nachweisen, aus welcher auf einen chemischen Angriffspunkt geschlossen werden konnte.

HCC wirkte sensibilisierend auf die Kaliumkontraktur am Skelettmuskel und scheint Hemmungen des Milchsäurestoffwechsels im Sinne des Lundsgaard-Effektes auszulösen. Bei den vorstehenden Versuchen waren γ-Fraktion und technisches Gemisch quantitativ gleich wirksam, während bei Insekten die γ-Fraktion mindestens 10mal giftiger war. Die Toxizität von HCC wurde bei Ratten peroral in verschiedenen Lösungsmitteln geprüft. Die tödliche Dosis lag in Rizinusöl bei 1500 mg pro kg, in Lebertran bei 1000 mg/kg, in Paraffinöl bei 1200 mg/kg und als wäßrige Emulsion bei 1500 mg/kg. Demnach ist die Toxizität des Insektizid bei einmaliger Gabe gering. Fette, wie Lebertran, steigern die Toxizität etwas, Rizinusöl dagegen nicht. Gleichzeitige Versuche an der γ-Fraktion in Lebertran ergaben dafür eine 5—10mal höhere Toxizität mit 100—200 mg/kg. Die Wirkungsgeschwindigkeit war gering, erste Vergiftungserscheinungen traten nach 48 Std auf, der Tod erfolgte frühestens nach 3—4 Tagen. Die γ-Fraktion war schneller wirksam. Bei

intraperitonealer Injektion in Lebertran waren Gaben von 400 mg/kg des technischen Isomerengemisches und 50 mg/kg der γ-Fraktion tödlich. Der Tod trat auch hier erst nach 40 (techn.) bzw. 3 Std (γ-Fraktion) auf.

Das Vergiftungsbild spricht für einen Angriff des HCC an höheren Gebieten des Zentralnervensystems mit Ausschluß des Rückenmarkes.

Wiederholte Gaben dieses langsam und lang anhaltend wirkenden Stoffes führten zu kumulativen Wirkungen bei täglicher Zufuhr. 6 Tage lang verabreicht waren kumulative Effekte nachweisbar, wenn mehr als 25% der tödlichen Dosis gegeben wurden. Auch bei Berücksichtigung dieser Kumulationsneigung dürfte aber die Wirkungsbreite des Stoffes bei praktischer Verwendung (insbesondere des technischen Isomerengemisches) vollkommen ausreichend sein.

An 2 Hunden wurden orientierende Versuche über die Ausscheidung bei hoher Dosierung ausgeführt. Für den Nachweis wurde eine biologische Test-Reaktion mit Fliegen in Petrischalen ausgearbeitet. Nach diesen Befunden wird der Stoff innerhalb von 24 Std, soweit er nicht resorbiert wird, mit dem Kot ausgeschieden. Resorbierte Bestandteile konnten im Harnextrakt nicht in wirksamer Form nachgewiesen werden.

Literatur.

[1] Jores u. Wolter: Klin. Wschr. **1939**, 885. — [2] Sollmann: Man. of Pharm. **1948**, 584. — [3] Merck Ber. **57—60**, 294. — [4] Eggers: Lt. briefl. Mitteilung u. Vortrag in Hamburg, Med. Ges., 1949. — [5] Haury: Die chem. techn. Industrie, Nr. 2, S. 44, 1948. — [6] Taylor: Nature **85**, Nr 3935 (1945). Zit. nach Haury. — [7] Philippot u. Dallemagne: Ber. Physiol. **135**, 436. — [8] McNamara und Mitarb.: J. of Pharmacol. **92**, 147 (1948). — [9] Velbinger: Pharmazie **4**, 165 (1949). — [10] Oelkers u. Ratje: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **198**, 327 (1941). — [11] Eichholtz: Lehrb. d. Pharmak. 4. Aufl., S. 363. 1944. — [12] Eichholtz u. Ehrhardt: Dtsch. tropenmed. Z. **46**. 275 (1942). — [13] Ehrhardt: Dtsch. med. Wschr. **1949**, 406. — [14] Ehrhardt u. Gieser: Dtsch. tropenmed. Z. **45**, 531 (1941). — [15] Bettner: Inaug. Diss. Göttingen 1949. — [16] Oelkers: Pharm. Grundl. d. Behandl. von Wurmkrankh., 2. Aufl. Leipzig 1944. — [17] Trendelenburg, P.: Arch. f. exper. Path. **79**, 197 (1916). — [18] Führer, H.: Arch. f. exper. Path. **82**, 81 (1917). — [19] Brücke u. Sarkander: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **195**, 80 (1940). — [20] Straub, W.: Dtsch. med. Wschr. **1911**, 1462. — [21] Straub, W.: Klin. Wschr. **1924**, 1993. — [22] Bacq, Z. M.: Arch. int. Pharmacodynamie **63**, 59 (1939). — Acta Biol. (Belg.) **1**, 169 (1941). — [23] Bacq, Z. M.: Enzymologia (Haag) **10**, 48 (1941). — [24] Lundsgaard, E.: Biochem. Z. **217**, 162 (1930). — [25] Hoffmann u. L. Lendle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 223 (1948). — [26] Oelkers u. Zessler: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **200**, 518 (1942).

Prof. Dr. L. Lendle, Göttingen, Pharmakol. Institut, Geiststr. 9.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 137—158 (1950).

Aus der Chirurgischen Universitätsklinik in Freiburg
(Direktor: Prof. E. Rehn).

Beiträge zur Pharmakologie cancerogener Substanzen.

Versuche mit Anilin*.

Von
Hermann Druckrey.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 19. September 1949.)

Die Anschauungen über die Ätiologie des *Krebses* beim Menschen haben in den letzten Jahren einen entscheidenden Wandel erfahren. Während bisher der Vererbung die größte Bedeutung beigemessen wurde, haben die Ergebnisse der Vererbungsforschung eindeutig gezeigt, daß erbliche Faktoren nur in seltenen Ausnahmefällen eine maßgebliche Rolle spielen. Auch der sogenannte „spontane" Brustkrebs bei bestimmten Mäusestämmen, der früher für erblich gehalten wurde und als beste Analogie zum menschlichen Krebs galt, ist nach gesicherten Ergebnissen von Bittner[1] nicht erblich bedingt, sondern wird durch einen in der Muttermilch der anfälligen Mäuse enthaltenen „Faktor" von virusähnlichen Eigenschaften übertragen.

Im gleichen Sinne spricht die klinische Erfahrung mit aller Klarheit gegen die alleinige causale Bedeutung erblicher Faktoren und zeigt, daß die meisten Geschwülste (schon ihrer Lokalisation nach) durch endogen entstandene oder „exogene" krebserzeugende Reize verursacht sein müssen[2]. Damit gewinnt die von der experimentellen Forschung bearbeitete Krebserzeugung durch cancerogene Agentien (Strahlen, Virus und cancerogene Substanzen), die lange Zeit als ein zwar interessantes, aber praktisch nicht in Frage kommendes Modell für den Krebs beim Menschen angesehen wurde, eine entscheidende Bedeutung. *Die Krebsentstehung ist ein pharmakologisch-toxikologisches Problem geworden.*

Dieser entscheidende Wandel der Anschauungen war vorauszusehen, denn die cancerogene Wirkung *chemischer* Substanzen (Teer: P. Pott 1775, v. Volkmann 1875; Anilin-Derivate: L. Rehn 1895) sowohl wie auch die von *Strahlen* (Lichtkrebs: Unna 1894; Röntgenkrebs: Frieben 1902 und Hitzekrebs „Kangrikrebs": Neve 1923) wurde am *Menschen* entdeckt. L. Rehn[3] war der erste, der auf Grund seiner Beobachtungen am Blasenkrebs der Farbstoff-Fabrikarbeiter den fruchtbaren Gedanken aussprach, daß definierte chemische Substanzen Krebs erzeugen können.

* Mit Unterstützung der Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft. Herrn Prof. E. Rehn zum 70. Geburtstag.

2.

Soweit cancerogene *Substanzen* als Krebsursache in Frage kommen, und sie scheinen praktisch die größte Bedeutung zu haben, handelt es sich um ein pharmakologisches Problem im engeren Sinne. Eigene Versuche zur Analyse des Wirkungsmechanismus cancerogener Substanzen ergaben die Gültigkeit der allgemeinen pharmakologischen Erfahrungen und Gesetzmäßigkeiten auch für diese Wirkungsqualität[4].

Das besondere Merkmal der cancerogenen Wirkung dieser Substanzen (und das gleiche dürfte auch für die der Röntgenstrahlen gelten) scheint in der praktisch vollkommenen *Irreversibilität* zu liegen. Das cancerogene Dimethylaminoazobenzol erwies sich als sogenanntes „cumulatives Gift" (Summationsgift) in strengem Sinne[4]. Eine „unterschwellige Dosis", die keine Wirkung hat, gibt es insoweit bei cancerogenen Substanzen ebensowenig, wie bei Röntgenstrahlen hinsichtlich ihrer mutationsauslösenden Wirkung. In diesem Punkte unterscheiden sich die cancerogenen Substanzen von allen bisher bekannten Pharmaka, deren Wirkung entweder schnell („Konzentrationsgifte"), oder langsam („kumulierende Gifte") auf jeden Fall aber *reversibel* ist. Diese Verhältnisse wurden durch theoretische Untersuchungen zu klären versucht[5]. Je weniger die Wirkung eines Pharmakons reversibel ist, umso größer wird die Bedeutung des Faktors: *Zeit*. Die cancerogenen Substanzen bilden danach eine besondere Klasse unter den Pharmaka, bei ihrer Wirkung spielt der Zeitfaktor die größte Rolle. Für die *Wirkung* ist nicht mehr die Höhe der Einzeldosis entscheidend, sondern die Summe aller Einzeldosen über die Zeit, die als „Gesamtdosis" bezeichnet wird. Die Höhe der Einzeldosis bestimmt hier nur noch die Zunahme der Wirkung in der Zeiteinheit.

Über den *Angriffspunkt* der cancerogenen Wirkung ergaben unsere Versuche Folgendes: Die Wirkung greift an der Zelle an und zwar an einer Vielzahl von solchen Zellbestandteilen, die „höchstwertige" Steuerungszentren sind, wahrscheinlich im Zellkern liegen und die Fähigkeit zur Selbstreproduktion haben, also als „Erbträger" gelten können. Die Effekte sind irreversibel und werden bei der Zellteilung auf die Tochterzelle „*vererbt*". Aus diesem Grunde wurden die cancerogenen Substanzen als „Erbänderungsstoffe" bezeichnet[4, 5]. Ob die Cancerisierung der Zelle durch den Ausfall bzw. die „Blockade" solcher autoreproduktionsfähigen Elemente stattfindet, oder durch eine Änderung ihrer Funktion, was weniger wahrscheinlich sein dürfte, ist noch unbekannt. Ebenso sind genauere Angaben über die Natur der veränderten Zellbestandteile vor allem über ihre Beziehungen zu Chromosomen bzw. Genen zur Zeit noch nicht möglich. Es kann indessen Folgendes gesagt werden: Die Cancerisierung der Zelle ist im Gegensatz zur Genmutation wahrscheinlich kein „Einzeltreffer" Ereignis, sondern hat nach unseren Ergebnissen eine „Summation" von Einzeleffekten an der Zelle zur Vor-

aussetzung[4, 5]. Ob der Vorgang der cancerogenen „Erbänderung" einer Somazelle zur Krebszelle dennoch als „Mutation" bezeichnet wird, ist eine Frage der Definition des Mutationsbegriffes, der dann zum übergeordneten Begriff für alle „echten" Erbänderungen würde. Der an bestimmten Mäusestämmen gefundene, sicher mendelnde Erbgang der „Krebsdisposition"[6] spricht für eine enge Beziehung der durch cancerogene Substanzen veränderten Zellbestandteile zu chromosomalen Erbfaktoren (Genen). Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, daß die „Krebsdisposition" nach aller experimenteller Erfahrung niemals für den ganzen Organismus gilt, sondern offenbar in den verschiedenen Geweben ganz verschieden ist. Diese, wie weitere von Bauer[2] gewürdigte Argumente, machen es hochwahrscheinlich, daß der Angriffspunkt der cancerogenen Wirkung nicht an „einfachen" Strukturen oder Funktionselementen der Zelle zu suchen ist, sondern an „*Erbträgern*", wenigstens aber an autoreproduktionsfähigen Bestandteilen der Zelle. Damit erscheinen die cancerogenen Substanzen auch hinsichtlich des Angriffspunktes ihrer Wirkung als eine eigene Klasse von Giften.

3.

Krebs kann durch cancerogene Agentien nur dort ausgelöst werden, wo eine ausreichende „*Disposition*" dafür besteht. Je größer sie ist, um so leichter und schneller ist die Krebserzeugung möglich und um so größer ist die Zahl der an diesem Objekt wirksamen Substanzen, so daß bei genügend hoher Disposition schließlich auch „unspezifische" Noxen cancerogen sein können. Ist die Disposition dagegen nur gering, so erweisen sich nur relativ wenige Substanzen und auch nur in hoher Dosierung als wirksam, diese dann aber an fast allen Geweben. Da es zwischen stark wirksamen und schwachen cancerogenen Substanzen anscheinend alle Übergänge gibt, ist die Frage schwer zu entscheiden, welche Substanzen als „spezifisch" cancerogen bezeichnet werden können (vgl. Abschnitt 14). Die Dinge scheinen ähnlich zu liegen, wie bei der Entzündung, die ähnlich wie der Krebs ein recht „spezifischer" Lebensvorgang ist, obwohl ganz „unspezifische" Reize sie auszulösen vermögen. Damit ist der Begriff der „Spezifität" für die cancerogenen Substanzen umrissen.

Die „Disposition" für eine krebsige Entartung ist schon in den verschiedenen Geweben ein und desselben Individuums außerordentlich verschieden groß, erst recht bei verschiedenen Arten. Sie ist eine Eigenschaft der Zelle und scheint in der Labilität oder Reaktionsfähigkeit derjenigen Zellbestandteile zu liegen, die Angriffspunkt für die Wirkung der cancerogenen Agentien sind. Im Alter nimmt ihre Labilität anscheinend zu[4]. Hier liegt eine interessante Beziehung zu Ergebnissen der Mutationsforschung, die die verschiedene „Mutabilität" der Gene und die Zunahme der Mutabilität mit dem Alter erwiesen haben.

Die Bedeutung der „Disposition" des Objektes für die Wirkung ist indessen keine Besonderheit, die etwa nur bei den cancerogenen Substanzen gilt, sondern sie scheint grundsätzlich für alle Pharmaka mehr oder weniger gegeben zu sein[4], in starkem Maße z. B. für das Histamin. Ihre besondere Bedeutung für die cancerogene Wirkung scheint darin zu liegen, daß hier der Faktor: Zeit eine wesentliche Rolle spielt.

4.

Quantitative Versuche zur Krebserzeugung mit Dimethylaminoazobenzol haben uns gezeigt, daß der Krebs als scheinbarer „Alles- oder Nichts-Effekt" bei gegebener Disposition um so *früher* auftritt, je höher die Konzentration des Giftes am Wirkungsort während der Behandlungszeit ist. Danach ist die Wirkung der cancerogenen Substanzen darin zu sehen, daß der Zeitpunkt der Krebsentstehung durch sie vorverlegt wird. Ist ein Agens genügend stark wirksam, oder die verabreichte Dosis genügend groß, um diesen Zeitpunkt in den Erlebensbereich vorzurücken, so entsteht Krebs. Die bis zu seiner Manifestation verstreichende „Latenzzeit" ist nach allen experimentellen Erfahrungen nicht eine „physikalische", sondern eine „biologische" Zeit, die in Bruchteilen der Lebenserwartung der betreffenden Tierart zu messen ist. Auch in diesem Punkt bestehen interessante Beziehungen zu den Erfahrungen der experimentellen Genetik.

Die menschliche Bevölkerung ist hinsichtlich der vorhandenen Krebsdisposition „panmix"[2], es muß also stets mit dem Vorkommen einer Anzahl von Individuen gerechnet werden, die für eine bestimmte Krebsart stark „disponiert" ist. Sie erkranken unter Umständen schon „spontan" an Krebs. Da nun die Wirkung der cancerogenen Substanzen darin zu liegen scheint, daß sie den Zeitpunkt der Krebsentstehung vorverlegt, muß es für möglich gehalten werden, daß auch geringe Mengen einer cancerogenen Substanz, die für eine Krebserzeugung an „normalen" Menschen zu klein sind, doch an genügend „disponierten" zu Krebs führen können. Sei es, daß die Krebsmanifestation dadurch überhaupt erst in den Erlebensbereich hineingezogen wird, oder daß der betreffende Mensch „seinen" Krebs nun schon zu einem früheren Zeitpunkt bekommt, als dies „spontan" erfolgen würde. Dieser Sachverhalt scheint für alle cancerogenen Agentien zuzutreffen, auch für die ultravioletten Strahlen, wenn auch hier die Zahl der „ausreichend" disponierten Menschen (Xeroderma pigmentosum) sehr klein ist. Dennoch können ultraviolette Strahlen auch an „normalen" Individuen zu Hautkrebs führen, sofern die Dosis genügend hoch ist. Es handelt sich auch hier letzten Endes um ein Problem der *Dosis*. Bei allen anderen cancerogenen Agentien haben wir keinen Anhaltspunkt für die Häufigkeit, mit der bei Menschen eine hohe „Disposition" vorkommt, noch weniger läßt sich ihre Größe abschätzen. Wohl aber muß damit gerechnet werden, daß in der mensch-

lichen Bevölkerung Individuen vorhanden sind, die für bestimmte Geschwulstarten bzw. für die Wirkung einer bestimmten cancerogenen Agens hoch disponiert sind. Deshalb sind die cancerogenen Substanzen, mit denen der Mensch in Berührung kommt, „toxikologisch" besonders ernst zu nehmen.

5.

Die Erkenntnis, daß der Krebs beim Menschen in der Mehrzahl der Fälle durch cancerogene Faktoren verursacht sein muß, macht die Suche nach solchen in der Umwelt des Menschen zu einem wichtigen toxikologischen Problem. Soweit es sich um „exogene" Faktoren handelt, muß es möglich sein, durch ihre *Ausschaltung* eine aktive Krebsprophylaxe zu treiben. In einer Anzahl spezieller Fälle, vor allem bei Berufskrebsen in der Farbstoff-, Teer- und Radium-Industrie ist dies bereits mit bestem Erfolg gelungen. Diesen Weg auch für die Allgemeinheit zu gehen, stehen wir dagegen ganz am Anfang, doch aber mit guter Aussicht auf Erfolg.

Unsere Versuche über den Mechanismus der cancerogenen Wirkung am Beispiel des Dimethylaminoazobenzols[4] hatten ergeben, daß der Krebs nicht durch ein „Einzeltreffer" Ereignis entsteht, daß also nicht die zufällige seltene Einwirkung eines cancerogenen Agens mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit zu Krebs führt, sondern die Summation vieler Einzeleffekte bis zu einem „kritischen" Gesamtwert. Krebs ist die Folge einer „chronischen Vergiftung" per excellence. In toxikologischer Hinsicht bedeutet die cancerogene Wirkung insofern ein Novum, als hier eine anscheinend vollständige Irreversibilität vorliegt, so daß die Einzeleffekte über die ganze Lebensdauer voll summationsfähig bestehen bleiben. Danach müssen in erster Linie solche cancerogenes Reize als gefährlich angesehen werden, die — auch in kleiner Einzeldosis — *dauernd* über ein langes Leben auf den Organismus einwirken. Das gilt in erster Linie für *Lebensmittelzusätze*. Aus diesem Grunde war z. B. das Verbot der Verwendung des „Buttergelbs" als Lebensmittelfarbstoff eine notwendige Forderung und deshalb muß das Augenmerk auf solche cancerogenen Reize gerichtet werden, mit denen der Mensch nicht selten, sondern regelmäßig in ausreichenden Kontakt kommt. Damit sind die wesentlichen Grundlagen der Wirkung cancerogener Substanzen gekennzeichnet Dies mußte ausführlich geschehen, weil ihre ungenügende Beachtung vielfach zu falschen Vorstellungen geführt hat.

6.

Die Prüfung der verdächtigen Substanzen auf cancerogene Wirkung ist dann besonders schwierig, wenn der „negative" Nachweis zu erbringen ist, daß eine Substanz *keine* krebserregenden Eigenschaften besitzt. Nach den bisher vorliegenden experimentellen Erfahrungen kann

dieser Nachweis nur dann als erbracht angesehen werden, wenn folgende Bedingungen erfüllt waren:

1. Verwendung der chemisch reinen Substanz;
2. regelmäßige Zufuhr einer möglichst hohen Dosis in einer Applikationsart, die dem Wirkungscharakter der untersuchten Substanz entspricht („lokal" und „resorptiv" wirkende cancerogene Substanzen);
3. Ausdehnung der Versuche über die ganze Lebenszeit der Tiere;
4. Fütterung mit einer definierten Diät;
5. Verwendung einer Tierart bzw. von Tierstämmen, deren Empfindlichkeit gegenüber der cancerogenen Wirkung dieser Stoffklasse genügend gesichert ist;
6. Prüfung an einer genügend großen Tierzahl;
7. genaue Untersuchung *aller* Organe.

Soll darüber hinaus auch jede *gesundheitsschädigende* Wirkung ausgeschlossen werden, so ist zu fordern, daß

8. die histologische Untersuchung der wichtigsten parenchymatösen Organe einen normalen Befund liefert;
9. die Sterblichkeitskurve der Versuchstiere nicht von der der Kontrolltiere abweicht.

Nach diesen Gesichtspunkten haben wir mit der Untersuchung einiger Lebensmittelfarbstoffe begonnen. Der viel verwendete Farbstoff „Chrysoin SG X", das 2 : 4 dioxyazobenzol 2′ : 4′ disulfonsaure Natrium erwies sich dabei als *frei* von krebserregenden und gesundheitsschädigenden Wirkungen an der Ratte.[6a]

Versuche mit Anilin.

7.

Die meisten Lebensmittelfarbstoffe und viele Arzneimittel sind Derivate des *Anilins*. Über die grundsätzlich wichtige Frage, ob das Anilin cancerogen wirksam ist, besteht keine Klarheit. L. REHN[3], der als erster den Blasenkrebs bei Arbeitern in Fuchsinfabriken beschrieben hat, dachte zwar auch an eine ursächliche Bedeutung dieser Substanz, ohne sie allerdings als wesentliche Krebsursache zu bezeichnen. Vielmehr führte er schon in seiner 1. Mitteilung[3] u. a. Substanzen wie das o-Toluidin, das Benzidin und das β-Naphtylamin an, die ebenfalls in den Fuchsinfabriken auf die Arbeiter eingewirkt haben. Die cancerogene Wirksamkeit dieser letztgenannten Substanzen am Menschen ist erwiesen[7] und konnte inzwischen auch experimentell nachgewiesen werden[8]. Die Schwierigkeit in der Beurteilung der Frage, ob das Anilin als cancerogenes Agens für den Blasenkrebs der Arbeiter verantwortlich zu machen ist, liegt darin begründet, daß das in der Farbstoffindustrie benutzte „Anilinöl" große Mengen des cancerogen wirksamen o-Toluidin

und auch β-Naphtylamin enthielt. Durch *reines* Anilin soll in der Industrie auch bei der Einwirkung über 20 Jahre kein Krebs entstanden sein[9]. Deshalb wird seine cancerogene Wirksamkeit in England bezweifelt. Demgegenüber gibt Prof. Gros*, der Gewerbearzt der früheren I. G.-Farben-Industrie an, daß er auch an Arbeitern, die mit reinem Anilin arbeiteten, Blasengeschwülste gesehen habe. Er betont indessen, daß o-Toluidin und vor allem β-Naphtylymin am Menschen sicher und sehr häufig Blasenkrebs auslösen. Nach Ausschaltung dieser Substanzen durch gewerbehygienische Maßnahmen trete praktisch kein Krebs mehr auf.

In der experimentellen Forschung haben Perlmann und Stähler[10] an Ratten nach subkutaner Gabe von täglich 6 mg Anilin einen „Tumor" bei einem von 10 Tieren beobachtet. Sie bezeichnen ihn aber weder selbst als Krebs noch spricht der histologische Befund dafür. Dagegen beobachtete White[11] nach Anilin-Fütterung in 10% der Fälle Hepatome und Milzsarkome. Blasenpapillome erzielten Yamazaki und Sato[12] bei Kaninchen nach Einführung von 1%igem Anilin-Wasser in die Blase, nicht aber nach subkutaner Injektion. Dem stehen negative Befunde verschiedener Autoren gegenüber, z. B. von Beerenblum und Bonser[13], die Anilin per os, intraperitoneal und als Inhalat an Kaninchen und Ratten gaben, sowie neuerdings von Miller[14].

So besteht über die Frage, ob das Anilin als cancerogene Substanz anzusehen ist oder nicht, keinerlei Klarheit. Die positiven Ergebnisse haben keine Beweiskraft, weil ihre Zahl zu klein ist, und weil eine Verunreinigung des Anilins durch die cancerogenen Substanzen o-Toluidin und β-Naphthylamin nicht ausgeschlossen werden kann. Aber auch die negativen Befunde erlauben keinen zwingenden Schluß, weil die verwendeten Tierzahlen zu klein, die applizierten Dosen zu gering und die Versuchsdauer zu kurz waren.

8.

Bei der hohen Bedeutung des Anilins als Grundsubstanz vieler wichtiger Stoffklassen erschien die Klarstellung seiner cancerogenen Wirksamkeit dringend notwendig. Dies um so mehr, als die meisten Lebensmittelfarbstoffe Azoverbindungen sind und die Azobindung im Organismus sicher zumindestens reduktiv gespalten werden kann[15], so daß nun Anilin bzw. seine Homologe im Körper auftreten.

Die Anilin Base ist meist nicht chemisch rein und verändert sich außerdem leicht unter der Einwirkung von Licht, Sauerstoff und Alkali (Glas). Bei jahrelanger Versuchszeit, wie sie zur Krebserzeugung erforderlich ist, ist es daher sehr schwer zu entscheiden, ob etwa entstandene Geschwülste durch das Anilin selbst verursacht sind oder durch Verun-

* Mündliche Mitteilung.

reinigungsprodukte. Aus diesem Grunde wurde für die hier geschilderten Versuche das wesentlich stabilere Anilinchlorhydrat (pro Analysi „Merck") verwendet, das durch Umkristallisation gereinigt wurde. Es hatte den geforderten Schmelzpunkt von 199°. Die Aufbewahrung erfolgte unter Ausschluß von Licht.

Die durch die vorliegenden Versuche angestrebte Entscheidung der Frage, ob das Anilin bei *chronischer* Gabe über die ganze Lebenszeit der Tiere *bleibende* gesundheitsschädigende Wirkungen hat und speziell Krebs auslösen kann, erscheint nach allgemeiner pharmakologischer Erfahrung um so eher möglich, je höher die angewendete Dosierung ist[4]. Anilin hat indessen starke akut toxische Wirkungen (Bildung von Hämiglobin). Aus diesem Grunde mußte eine Applikationsart gewählt werden, bei der die tägliche Dosis nicht auf einmal sondern möglichst gleichmäßig über den ganzen Tag verteilt aufgenommen wird. Die Einatmung von Anilindämpfen, die für die Entstehung des Blasenkrebs beim Menschen besonders verantwortlich gemacht wird, kam nicht in Frage, weil diese Art der Zufuhr für jahrelange Versuche praktisch undurchführbar ist und weil das Anilin sich an der Luft verändert. Deshalb wurde es ins *Trinkwasser* gegeben. Der Resorptionsweg kann für die Wirkung einer so leicht resorbierbaren Substanz wie Anilin keine so entscheidende Rolle spielen. Das zeigten z. B. die Versuche mit o-Toluidin und β-Naphthylamin, die, wenn sie zu Blasenkrebs führten, dies sowohl bei subkutaner, wie auch bei oraler oder pulmonaler Gabe taten. In Vorversuchen wurde festgestellt, welche Tagesdosis Anilin bei Gabe in das Trinkwasser von den Ratten gerade noch freiwillig aufgenommen wird, ohne akute Giftwirkungen auszulösen. Das war bei 22 mg Anilin hydrochlorid pro Tag und Ratte der Fall, entsprechend etwa 16 mg Base.

9.

Als Versuchstiere wurden 50 Ratten aus 2 verschiedenen Mischzuchten verwendet, die sich in vorangegangenen Vorversuchen als empfänglich für die cancerogene Wirkung des 3 : 4 Benzpyrens und des Dimethylaminoazobenzols erwiesen hatten. Die Ratten kamen im Alter von 100 Tagen in Versuch und erhielten die folgende Diät: Hafer, Kartoffeln und Weizenmehl, Fischmehl, getrocknete Garneelen und Magermilch unter Zugabe eines Salzgemisches und von Lebertran, Hefeplasmolysat und Bäckerhefe. Die tägliche Zufuhr an Vitamin B_1 betrug etwa 16 γ, an Vitamin B_2 21 γ pro Ratte.

Die Tiere wurden bis zum Tode sehr sorgfältig gehalten, um eine möglichst lange Lebenszeit zu erzielen. Die Hälfte der Ratten überlebte eine Behandlungsdauer von mehr als 425 Tagen, erlebte also ein Alter von 525 Tagen, da sie bei Versuchsbeginn durchschnittlich 100 Tage alt waren. Die längste erreichte Behandlungsdauer betrug 750 Tage, die

längste Lebensdauer also 850 Tage. In dieser Zeit hatte jedes überlebende Tier insgesamt 16,5 g Anilin aufgenommen (vgl. Abb. 1).

Die Tiere wurden nach eingetretenem Tode sorgfältig seziert. *In keinem Falle fand sich eine Geschwulst.* Zur histologischen Aufarbeitung kamen folgende Organe: Harnblase, Leber, Milz und Niere. Die Untersuchung erfolgte durch den auf diesem Spezialgebiet besonders erfahrenen Pathologen Prof. HAMPERL. In keinem einzigen Falle wurden Geschwülste oder Anzeichen einer beginnenden Geschwulstbildung beobachtet.

Da fast die Hälfte der Versuchsratten eine Behandlungszeit von mehr als 500 Tagen überlebte, und einige Tiere länger als 800 Tage lebten, in dieser Zeit also mehr als 14 g Anilin Hydrochlorid aufgenommen haben (das ist fast 10% ihres Körpergewichts), *kann das reine Anilin hydrochlorid nicht als cancerogen wirksam angesehen werden.*

In der Literatur wird stellenweise die Meinung vertreten, daß die Anilin Homologen nur bei Applikation als freie Basen cancerogen wirksam seien, nicht aber als Hydrochloride. Experimentelle Belege werden dafür nicht angegeben. Wenn auch zwischen beiden Formen ein grundsätzlicher Unterschied insofern besteht, als der Stickstoff in den Basen dreiwertig und in den Hydrochloriden fünfwertig ist, so ist doch ein qualitativer Unterschied zwischen der *resorptiven* Wirkung der Base und der ihres Salzes, also z. B. des Anilins bzw. seines Chlorhydrats vom pharmakologischen Standpunkt aus unwahrscheinlich, weil die Form, in der sich das Anilin im (ohnehin chloridreichen) Organismus befindet, allein von der hier herrschenden Wasserstoffionenkonzentration abhängt. Bei der aktuellen Reaktion des Blutes liegt das Anilin überwiegend als Base vor. Die gleichzeitige Aufnahme von Salzsäure (Anilin hydrochlorid) kann lediglich die Ausscheidung verstärken und das Gleichgewicht etwas nach der Seite des Anilinsalzes verschieben und damit so wirken, wie wenn eine etwas kleinere Dosis Anilin Base gegeben worden wäre, kann aber niemals die Wirkung des Anilins grundsätzlich ändern. In orientierenden Versuchen mit dem cancerogenen Dimethylaminoazobenzol fand ich*, daß diese Substanz auch als Hydrochlorid gegeben Leberkrebs erzeugt. Schon bei Zugabe eines Mehlkleisters zu einer roten Lösung des Farbstoffsalzes fällt die schwer lösliche Base sofort aus, wobei die Farbe in gelb umschlägt. In diesem Sinne sprechen die vorliegenden Befunde gegen eine cancerogene Wirksamkeit des reinen Anilins an Ratten. Wenn trotzdem von anderen Untersuchern mit dieser Substanz vereinzelt Geschwülste erzeugt werden konnten, so dürfte das wahrscheinlich darauf zu beziehen sein, daß entweder das verwendete Tiermaterial eine ungewöhnlich hohe Disposition zu Blasenkrebs hatte, oder — wahrschein-

* Nicht veröffentlicht.

licher — darauf, daß das verwendete Anilin durch o-Toluidin oder β-Naphthylamin verunreinigt war, denn diese Substanzen können nach der vorliegenden experimentellen Erfahrung sicher Blasenkrebs erzeugen. Das Auftreten von Blasenkrebs bei Arbeitern in Anilinbetrieben dürfte ähnlich zu erklären sein. Da aber auch nach Einwirkung reinen Anilins am Menschen gelegentlich Blasenkrebs beobachtet wurde (Prof. GROS), muß gefolgert werden, daß beim Menschen eine höhere „Disposition" für Blasengeschwülste vorkommt, als bei den hier verwendeten Rattenstämmen.

10.

Die cancerogene Wirksamkeit von Azofarbstoffen soll nach Untersuchungen von KENSLER, DEXTER und RHOADS[16] in Beziehung zu ihrer Eigenschaft stehen, die Karboxylase der Hefe zu hemmen. Die Wirkung wird auf Homologe des Paraphenylendiamins bezogen, die aus p-amino-Azobenzol-Verbindungen durch reduktive Aufspaltung der Azobindung entstehen, und zwar soll die Wirksamkeit von der Beständigkeit der freien Radikale (WURSTERsche Farbsalze) abhängen, die durch Oxydation aus ihnen gebildet werden.

R. KUHN und BEINERT[17] haben diese Angaben nachgeprüft und gefunden, daß alkylierte Paraphenylendiamine keine Hemmungswirkungen auf Karboxylase Präparate haben, wohl aber WURSTERS Rot oder Blau, und zwar um so stärker, je mehr Brom sie enthalten. Sie führten weiter den Nachweis, daß bei der weiteren Oxydation *Benzochinon* entsteht, und daß dies außerordentlich stark hemmend auf die Karboxylase wirkt. Reduktion des Benzochinons durch Ferro-Verbindungen oder Zystein hebt die Wirksamkeit auf. (!)

Mit diesen Befunden wurden 2 wichtige Fragen aufgeworfen, nämlich 1. die nach der cancerogenen Wirksamkeit von *Chinonen* und 2. die nach der Bedeutung von *Fermentvergiftungen* im Wirkungsmechanismus cancerogener Substanzen.

STOLTZENBERG und BERGIUS[18], deren Anschauungen über den Mechanismus der cancerogenen Wirkung ihrer Zeit weit voraus gingen, — sie sahen das Wesen dieser Wirkung in irreparablen Veränderungen am Zellkern — stellten zuerst die *Chinone* als cancerogene Substanzen zur Diskussion. Ein positiver Befund wurde indessen erst 1940 und bisher nur von TAKIZAWA[19] berichtet, der nach Pinselung von Mäusen mit Benzochinon und α-Naphtochinon bei einer Behandlungsdauer von mehr als 200 Tagen 3 Krebsgeschwülste beobachtete. Auf Grund dieses Befundes glauben KUHN und BEINERT[17], daß die cancerogene Wirkung des Dimethylaminoazobenzols („Buttergelb") (I) auf Benzochinon bezogen werden könnte, das nach Aufspaltung der Azobindung durch Oxydation des N-dimethyl-Paraphenylendiamins (II) entsteht. Gegen diese

Ansicht über den Wirkungsmechanismus des „Buttergelbs" spricht aber der von ihnen selbst gemachte Einwand, daß das N-dimethyl-Paraphenylendiamin an der gleichen Tierart (Ratte), an der „Buttergelb" sicher cancerogen wirkt, keinen Krebs auslöst[14, 20]. Außerdem ist anzunehmen, daß im Körper aus Anilin wenigstens ebenso leicht Benzochinon gebildet wird, wie aus Dimethylaminoazobenzol oder aus Dimethylparaphenylendiamin. Dann müßte aber Anilin ebenso cancerogen sein, wie „Buttergelb". Das ist nach den hier mitgeteilten Versuchen aber sicher nicht der Fall, denn selbst bei einer Gesamtdosis von mehr als 15 g Anilin hydr. pro Ratte entstanden weder Geschwülste noch Leberschädigungen, während beim „Buttergelb" schon eine Gesamtdosis von 0,7—1 g Krebs erzeugte. Danach kann die Wirkung des „Buttergelbs" nicht auf eine intermediäre Entstehung von Benzochinon bezogen werden. Butenandt* und ebenso Kennaway[21] konnten die positiven Befunde von Takizawa mit Benzochinon dann auch nicht bestätigen. Vielleicht sind sie bei Takizawa auf eine hohe Krebsanfälligkeit seiner Mäuse zu beziehen, denn es gelang diesem Forscher, auch durch Glukoseinjektionen an Mäusen Sarkome zu erzielen[22].

Es ist aber von Interesse, daß Chinone eine außerordentlich starke schädigende Wirkung auf die *Mitose* haben[23], wobei das Benzochinon bis $5 \cdot 10^{-7}$ und das Naphtochinon sogar bis 10^{-7} wirksam ist[24]. Friedmann[25], der die Beziehungen zwischen der chemischen Konstitution und der mitoseschädigenden Wirksamkeit dieser Stoffe untersuchte, bestätigte diese Befunde und fand ganz allgemein die Konfiguration

$$O = CH - CH = CH - CH = O$$

wirksam. Hier ist indessen zu beachten, daß die Mitosegiftwirkung mit der cancerogenen Wirkung nichts zu tun hat, wie zahlreiche Beispiele zeigen (Colchicin, Lost, Purinkörper, Trypaflavin u. a.).

Die aromatischen Kohlenwasserstoffe mit cancerogener Wirksamkeit bilden relativ leicht Chinone[26]. Anderson[27] fand, daß bei Oxydation sowohl der cancerogenen Kohlenwasserstoffe als auch der cancerogenen Azofarbstoffe mit Bromwasser Lumineszenz auftritt und kam danach zu der Meinung, daß eine Substanz dann cancerogen ist, wenn bei ihrem Stoffumsatz eine genügende Strahlenenergie frei wird. Es ist aber unwahrscheinlich, daß die Wirkung dieser Substanzen durch ihre Chinone bedingt ist, denn nach Cook und Martin[28] entstehen bei der Photooxydation der carcinogenen Kohlenwasserstoffe keine Chinone und es besteht auch keine Beziehung sowohl zwischen der Neigung zur Photooxydation und der cancerogenen Wirksamkeit, als auch zwischen der cancerogenen Wirksamkeit aromatischer Kohlenwasserstoffe und dem r_H ihrer Chinone[29]. Wohl aber scheint die cancerogene Wirkung auf der

* Mündliche Mitteilung.

B-Elektronendichte an bestimmten Molekülstellen der aromatischen Kohlenwasserstoffe zu beruhen, was zuerst von O. SCHMIDT[30] vermutet worden ist. Nach BOYLAND[31] beginnt die cancerogene Wirksamkeit, wenn die Elektronendichte an einer Stelle größer ist, als 1,29 eV und ist um so stärker, je größer diese ist. Hierin scheint also die Wirksamkeit begründet zu liegen und nicht in der Bildung der Chinone. Vielmehr ist aus zahlreichen Untersuchungen sowohl von aromatischen Kohlenwasserstoffen[32] als auch von Azokörpern[33] bekannt, daß die Einführung von phenolischen Hydroxylgruppen in das Molekül die cancerogene Wirksamkeit sehr stark herabsetzt oder ganz aufhebt.

11.

Die von RHOADS und Mitarbeitern[14] geäußerte Vermutung, daß die cancerogene Wirksamkeit des „Buttergelbs" mit ihrer Eigenschaft in Beziehung stehen soll, die Karboxylase der Hefe zu vergiften, wirft das Problem auf, ob die cancerogene Wirksamkeit auf einer Vergiftung von Fermenten beruht. Mit dieser Frage hat sich vor allem RONDONI[34] beschäftigt. Er fand z. B. eine verstärkte Lipase und Autolyse Aktivität in Geweben mit Benzpyren behandelter Tiere.

KUHN und BEINERT[17] wiesen nun darauf hin, daß Benzochinon und zahlreiche andere untersuchte Chinone nicht nur die Karboxylase vergiften, sondern allgemein starke Fermentgifte sind*. Darüber hinaus halten sie es für möglich, daß die cancerogene Wirkung auf einer *Vergiftung von Fermenten* beruhe.

Anilin wird im Organismus oxydiert zum Paraminophenol, Chinonimin und wahrscheinlich auch zum Benzochinon. Dabei treten Zwischenprodukte auf, wie das Phenylhydroxylamin und Substanzen von Radikalnatur, die Fermentgifte sind, z. B. das Hämoglobin in Hämiglobin umwandeln, worüber HEUBNER[35] und seine Schule ausgedehnte Versuche angestellt haben.

Die Wirkung der *Fermentgifte* ist im allgemeinen *reversibel* und speziell ist es die Hämiglobin-(Methaemoglobin)-Bildung, sogar in vitro[36]. Demgemäß findet sich hier auch eine direkte Beziehung zwischen der Stärke der Wirkung und der Höhe der augenblicklich vorhandenen Giftkonzentration. Sinkt sie, so nimmt auch die Wirkung ab („cessante causa cessat effectus").

Die cancerogene Wirkung ist im Gegensatz dazu ein völlig *irreversibler* Vorgang[37] („cessante causa *non* cessat effectus"). Aus diesem Grunde kann die cancerogene Wirkung nicht auf einer *reversiblen* Fermentvergiftung beruhen. Beide Wirkungen sind grundverschieden, die Fermentgifte sind „Konzentrationsgifte", die cancerogenen Substanzen dagegen

* Literatur bei KUHN[17].

ausgesprochene „ct Gifte", gehören also pharmakologisch zu einer ganz anderen Gruppe[38].

Nun hat aber Heubner[39] gezeigt, daß auch solche Gifte, deren Wirkung als vollkommen reversibel gilt (z. B. Narkotika), doch einen abnormen Zustand an Zellen hinterlassen können, der „für sich *weiterbesteht*" und nach einem Vorschlag von Heubner als „allobiotischer Zustand" bezeichnet wird. Er tritt um so mehr in Erscheinung, je länger das Gift eingewirkt hatte, bzw. je häufiger es angewandt wurde und ist die Grundlage für das Auftreten einer „chronischen Vergiftung"[39]. Nach unseren theoretischen Untersuchungen[5] über diesen wichtigen Gegenstand beruht diese Erscheinung darauf, daß derartige Gifte eben keine reinen „Konzentrationsgifte" sind, sondern daß vielmehr ein Teil ihrer Wirkung schwer oder gar nicht reversibel ist, oder daß sie neben der reversiblen Hauptwirkung (z. B. narkotischen) noch eine andersartige (z. B. parenchymschädigende), schwer reversible Wirkung haben, die sie als „kumulierende" oder „ct Gifte" erscheinen läßt. Das scheint für viele Gifte zuzutreffen und wird von Heubner[39] z. B. gerade für ein „Blutgift" (Kohlenoxyd) diskutiert.

Aus diesem Grunde war die Frage zu klären, ob das Anilin bei chronischer Anwendung „allobiotische" Zustände bewirken kann.

Das Anilin ist ein Blutgift. Oxydationsprodukte von ihm, die im Körper entstehen, oxydieren den Blutfarbstoff zu Hämiglobin (Methämoglobin). Da nun bei vielen Krebskranken eine Schädigung des roten Blutbildes beobachtet wird und auch manche cancerogenen Substanzen zu einer solchen führen[2], schien ein Zusammenhang zwischen der Blutgift- und der cancerogenen Wirkung denkbar.

Tabelle 1. *Einfluß einer Dauerbehandlung mit 22 mg Anilin hydr. pro Tag und Tier auf den Hämoglobin- und Methämoglobingehalt des Blutes von Ratten, sowie Wirkung einer einmaligen Anilindosis von 150 mg/kg auf chronisch vorbehandelte und unvorbehandelte Ratten. Angabe des Hämoglobins in g%, des Methämoglobins in Prozenten des Hämoglobingehaltes.*

Anilin Vorbehandlung				Belastung mit 150 mg/kg Anilin hydr. per os nach 2 Std		nach 24 Std	
Dosis mg/Tag	Dauer Tage	Hb g %	Methb. %	Hb g %	Methb. % σ	Hb g %	Methb. %
Kontrolle	0	9,7	0	8,9	17 ± 5,6	9,5	0
22	13	8,7	1,8	7,8	21 ± 4,2	8,9	1,9
22	461	9,7	1,5	8,4	17 ± 4,3	9,6	1,7

Das Hämoglobin im Blut läßt sich ebenso wie das Hämoglobin leicht und genügend exakt messen. Ersteres wurde bei den vorliegenden Versuchen als reduziertes Hämoglobin, letzteres nach der „Zyanidmethode" von Havemann, Jung und v. Issekutz[40] im Absolut-Kolorimeter von

HAVEMANN bestimmt. Wenn ein Teil der Hämiglobin bildenden Wirkung des Anilins irreversibel wäre, so müßte mit zunehmender Behandlungsdauer eine Anhäufung von Hämiglobin stattgefunden haben oder mindestens der Hämoglobingehalt des Blutes reduziert sein.

Deshalb wurden bei 19 Ratten, die 461 Tage lang täglich 22 mg, im Ganzen also mehr als 10 g Anilin hydrochlorid aufgenommen hatten, der Hämoglobin- und Hämiglobingehalt des Blutes bestimmt* und mit dem von normalen Ratten gleichen Alters verglichen. Zur Ergänzung wurde noch eine 3. Gruppe von 10 Ratten herangezogen, die nur 13 Tage mit der gleichen Dosis Anilin vorbehandelt war, wie die eigentliche Versuchsgruppe. 17 von den 19 lange Zeit vorbehandelten Ratten hatten kein nachweisbares Hämiglobin im Blut, bei einer waren 3,8% und bei einer zweiten 5,2% des Hämoglobins in Hämiglobin umgewandelt. Auch bei der 13 Tage vorbehandelten Gruppe hatten 2 Tiere Hämiglobin im Blut (3% bzw. 7,7%), die restlichen 8 Ratten dagegen nichts und ebenso alle 15 Kontrolltiere. Es hat also auch in der langen Behandlungsdauer von 461 Tagen keine Anhäufung von Hämiglobin stattgefunden (Tab. 1).

Es war nun denkbar, daß zwar das entstehende Hämiglobin stets vollständig zurückverwandelt worden wäre, daß aber dennoch eine zunehmende Schädigung der roten Blutkörperchen stattgefunden hätte. Aus diesem Grunde wurde auch das Hämoglobin bestimmt. In der Versuchsgruppe fand sich indessen derselbe Durchschnittswert, wie in der Kontrollgruppe, nämlich 9,7%.

Ein „allobiotischer Zustand" durch eine chronische Anilinvergiftung könnte sich nun auch dadurch äußern, daß die lange Zeit mit — insgesamt mehr als 10 g — Anilin vorbehandelten Tiere auf eine zusätzliche *akute* Anilinvergiftung hin mit einer stärkeren Hämiglobinbildung reagieren, als normale Kontrolltiere. Deshalb erhielten die Ratten in allen 3 Tiergruppen eine einmalige Gabe von 150 mg/kg Anilin hydrochlorid mit der Schlundsonde. 2 Std nach dieser Belastung wurde das Hämoglobin im Blut bestimmt.

Das Ergebnis dieser Versuche geht ebenfalls aus der Tab. 1 hervor. Die Hämiglobinbildung erreichte bei der lange mit Anilin vorbehandelten Gruppe denselben Wert, wie bei der Kontrollgruppe, bei der nur 13 Tage vorbehandelten Gruppe einen (innerhalb der Fehlerbreite liegenden) etwas höheren Wert. Nach 24 Std wurde die Bestimmung wiederholt, um zu prüfen, ob der Abfall des Hämiglobins bei den Versuchstieren verzögert erfolgt. Bei den Kontrolltieren fand sich kein Hämiglobin, in der 461 Tage vorbehandelten Versuchsgruppe 1,7%, in der 13 Tage vorbehandelten Gruppe 1,9%, also unabhängig von der Dauer der Vorbehandlung derselbe Wert. Hier ist die Rückbildung etwas verzögert, weil diese

* Ein erster Teil der Versuche wurde von Herrn Dr. LOCH durchgeführt, dem ich für seine Hilfe danke.

Tiere nach der Belastung und Untersuchung ihre Tagesgabe von 22 mg Anilin hydrochlorid erhalten hatten.

Diese Ergebnisse zeigen, daß auch eine langdauernde Vorbehandlung über 461 Tage mit mehr als 10 g Anilin Hydrochlorid pro Ratte weder zu einer Anhäufung von Hämiglobin noch zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber einer akuten Anilinvergiftung führt. Die Hämiglobinbildung durch Anilin ist demnach bei der Ratte vollständig *reversibel* und bleibt es auch bei langdauernder Behandlung mit hohen Dosen unverändert. Eine „chronische Anilinvergiftung" gibt es in dieser Hinsicht bei der Ratte nicht. Nach diesen Befunden kann die hämiglobinbildende Wirkung des Anilins, die als Modell einer Fermentgiftwirkung diente, keine ursächliche Bedeutung für die Krebsentstehung haben. Anilin ist ein reines „Konzentrationsgift", die cancerogenen Substanzen sind dagegen typische „et Gifte".

12.

Schwer reversible „Nebenwirkungen" eines sonst als „Konzentrationsgift" anzusehenden Pharmakons, die zu „allobiotischen" Zuständen und damit zu „chronischen Vergiftungen" führen, haben meist einen anderen Angriffspunkt, als die leicht reversible „Hauptwirkung". Gewöhnlich treten als Folge des immer weiter gesteigerten „allobiotischen" Zustandes bei der „chronischen Vergiftung" morphologisch faßbare Schädigungen an Zellen besonders der *parenchymatösen* Organe in Erscheinung[39]. Aus diesem Grunde wurden folgende Organe der chronisch mit Anilin behandelten Ratten histologisch genau untersucht*; Leber, Milz, Niere und Harnblase. Keines dieser Organe zeigte ein Bild, das irgendwie von dem der entsprechenden Organe unbehandelter gleichaltriger Tiere abwich. Die dauernde Behandlung von Ratten mit hohen Dosen Anilin hydrochlorid führte also zu keinen nachweisbaren Parenchymschädigungen. Auch in dieser Hinsicht läßt sich eine „chronische Anilinvergiftung" nicht nachweisen.

Chronische Vergiftungen, deren Angriffspunkt nicht näher bekannt ist, pflegen sich wenigstens in einer Erhöhung der *Sterblichkeit* auszudrücken. Deshalb ist die Aufstellung der Sterblichkeitskurve bei den zur Prüfung verwendeten Versuchstieren das wichtigste Kriterium für die Entscheidung der Frage, ob die geprüfte Substanz überhaupt gesundheitsschädigende Wirkungen besitzt oder nicht. Nur solche Substanzen, bei denen auch dieser „Test" negativ ausfällt, können in dem betrachteten Dosierungsbereich als frei von gesundheitsschädigenden Wirkungen bei chronischer Zufuhr über die ganze Lebenszeit angesehen werden.

---

* Die Untersuchungen wurden im Rahmen einer langjährigen Zusammenarbeit von Prof. H. Hamperl durchgeführt, dem ich sehr zu Dank verpflichtet bin.

Die Sterblichkeitskurve der täglich mit 22 mg Anilin hydrochlorid (also 110—220 mg/kg) behandelten Ratten ist in Abb. 1 dargestellt und mit der einer Kontrollserie aus den gleichen Rattenstämmen verglichen. Beide Kurven stimmen vollständig überein. Die mittlere Lebenserwartung liegt in beiden Fällen bei 530 Tagen, die höchste bei 850 Tagen. Auch an diesem empfindlichen „Test" ist keine gesundheitsschädigende Wirkung, kein Zeichen einer „chronischen Anilinvergiftung" nachzuweisen, und damit kein Anhaltspunkt für irgendwelche „Teileffekte",

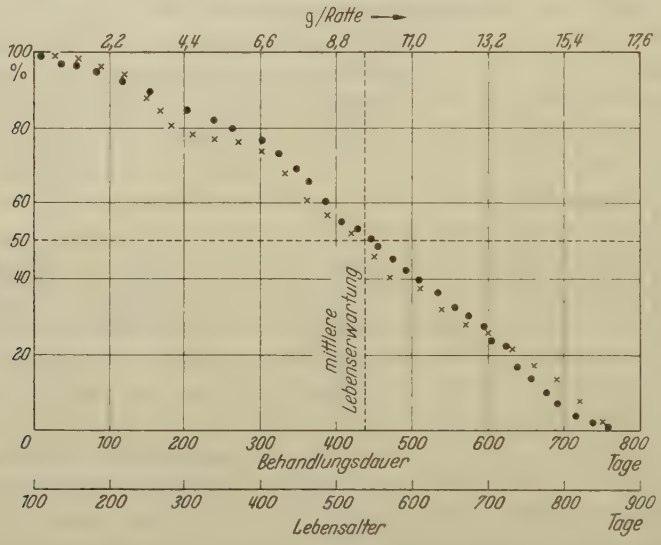


Abb. 1. Sterblichkeitskurve von 50 Ratten unter dauernder Behandlung mit 22 mg Anilin hydrochlorid pro Tier und Tag (Kreuze) und von 100 unbehandelten Ratten gleicher Art (Punkte). Untere Abszisse: Behandlungsdauer bzw. Lebensalter in Tagen. Obere Abszisse: Aufgenommene Gesamtmenge Anilin hydr. in g/Tier. Ordinate: Prozentzahl der überlebenden Tiere.

die irreversibel sind. Das Anilin ist ein reines „Konzentrationsgift" und steht damit im Gegensatz zu den cancerogenen Substanzen, die echte „ct"-Gifte sind.

13.

In theoretischen Untersuchungen[5] haben wir den Versuch gemacht, aus den einfachen reaktionskinetischen Ansätzen abzuleiten, welche Größen allgemein die Wirksamkeit und den Wirkungscharakter von Pharmaka bestimmen und welche Typen der Giftwirkung theoretisch möglich sind. Das geschah aus dem Bedürfnis, über die der pharmakologischen Wirkung zu Grunde liegenden Gesetzmäßigkeiten Klarheit zu gewinnen, ohne die ein Verständnis der cancerogenen Wirkung nicht möglich erschien. Diese Untersuchungen ergaben, daß die *Zeitkonstante für die rückläufigen Vorgänge*, also für die *Reversibilität* der Wirkung die

entscheidende Bedeutung für den zeitlichen Verlauf der Wirkung und damit für den Wirkungscharakter hat. Je nach ihrer Größe erscheint ein Pharmakon als „Konzentrationsgift" oder als „ct Gift". Die Gifte mit „allobiotischer Wirkung" stellen einen „Mischtyp" von beiden dar, die „kumulierenden Gifte" einen „Zwischentyp", während besondere Verhältnisse zu den „Potentialgiften" und den Giften mit „Verstärkerwirkung" führen.

Am Beispiel des Dimethylaminoazobenzols wurde der experimentelle Nachweis geführt, daß es „ct Gifte" im strengen Sinne gibt, und daß die cancerogenen Substanzen zu diesem Gifttyp gehören. Die vorliegenden Untersuchungen mit Anilin an Ratten zeigen in dieser Ausdehnung erstmalig, daß es auch reine „Konzentrationsgifte" gibt, die selbst bei dauernder Zufuhr über die *ganze Lebenszeit* keine „chronische Vergiftung" erzeugen, obwohl sie starke akute Giftwirkungen haben können. Beide Arten der Giftwirkung sind also bemerkenswert unabhängig voneinander. Daraus ergibt sich die Folgerung, daß der Nachweis der Wirksamkeit einer zu prüfenden Substanz und noch mehr der der Unschädlichkeit nur durch den „akuten" *und* „chronischen" Versuch möglich ist. Substanzen, die im „akuten" Versuch unschädlich erscheinen, können ausgesprochene „ct Gifte" sein, wie z. B. die cancerogenen Substanzen, und umgekehrt solche, die bei chronischer Anwendung keine Giftwirkung erkennen lassen, können bei massiver Anwendung im „akuten" Versuch doch starke Giftwirkungen haben, wie das Anilin oder das Kochsalz. Weiter zeigen die experimentellen Erfahrungen mit cancerogenen Substanzen, daß es schwere Folgen der „chronischen Vergiftung" gibt, die erst dann in Erscheinung treten, wenn die Vergiftung über die *ganze Lebenszeit* geht. Die systematische Untersuchung der wichtigsten Pharmaka unter solchen Gesichtspunkten erscheint eine dringende Aufgabe. Über derartige Versuche mit Digitalis soll demnächst berichtet werden.

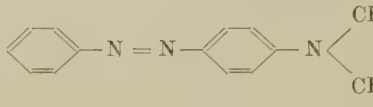
14.

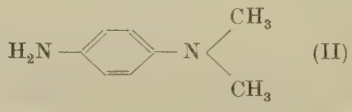
Der hier erhobene Befund, daß das reine Anilin keinen Krebs erzeugt und auch sonst keine irreversiblen Effekte hat, daß aber die nahe verwandten Toluidine und das β-Naphthylamin cancerogen sind, erscheint zunächst überraschend. Deshalb sollen die Konsequenzen geprüft werden, die sich für das Problem der Beziehungen zwischen der chemischen Konstitution der aromatischen Amine und ihrer cancerogenen Wirksamkeit nach diesen Befunden ergeben.

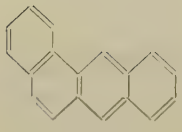
Nach systematischen Untersuchungen vor allem des Londoner Arbeitskreises (Kennaway, Cook) an aromatischen Kohlenwasserstoffen wird ihre cancerogene Wirksamkeit einerseits durch Substitution eines Alkylrestes, vor allem der Methylgruppe und andererseits durch Anfügen

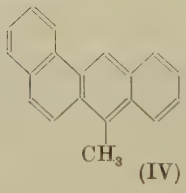
eines weiteren Benzolringes verstärkt. So ist z. B. das 1 : 2 Benzanthrazen (III) noch nicht cancerogen wirksam, wohl aber z. B. das 10-methyl-1 : 2 Benzanthrazen (IV). Die Substitution einer weiteren Methylgruppe in geeigneter Position und mehr noch die Anfügung eines weiteren Benzolringes (V) verstärken die Wirksamkeit weiter. Analog liegen die Verhältnisse bei den Derivaten des 3 : 4 Benzphenanthren. Auch diese Substanz ist nicht cancerogen, wohl aber z. B. das 2-methyl-3 : 4 Benzphenanthren.

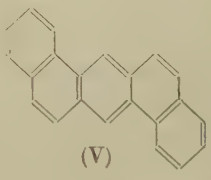
Bei den aromatischen Aminen ergibt sich nun folgendes Bild: Das Anilin (VI) ist „ebensowenig" cancerogen, wie z. B. das 1:2 Benzanthrazen oder das 3 : 4 Benzphenanthren. Die „methyl-Aniline" ortho- und para-Toluidin (VII) erzeugen dagegen Krebs und ebenso das („3 : 4 Benzanilin") β-Naphthylamin (VIII) sowie in noch stärkerem Maße das („Dibenzanilin") 2-Anthramin (IX). Bei den aromatischen Aminen liegen danach ganz ähnliche Beziehungen zwischen der chemischen Konstitution und der cancerogenen Wirksamkeit vor, wie bei den aromatischen Kohlenwasserstoffen.


(I)

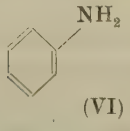

(II)


(III)

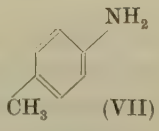

(IV)


(V)

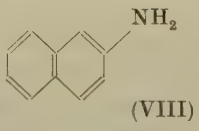
1:2 - Benzanthrazen 10-methyl-1:2 - Benzanthrazen 1:2:5:6 - Dibenzanthrazen


(VI)

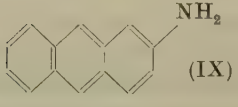
Anilin


(VII)

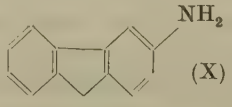
p - Toluidin


(VIII)

β - Naphthylamin


(IX)

2 - Anthramin


(X)

2 - Amino - Fluoren

Das Anilin ist also, obwohl es selbst „noch nicht" cancerogen ist, doch ebenso als „Muttersubstanz" cancerogener Verbindungen aufzufassen, wie das ebenfalls „noch nicht" cancerogene 1 : 2 Benzanthrazen oder 3 : 4 Benzphenanthren. Die Einführung der gleichen Substituenten macht aus allen 3 Verbindungen krebserzeugende Substanzen mit um so stärkerer Wirkung, je mehr Substituenten in geeigneter Position eingeführt werden. Es gibt also anscheinend fließende Übergänge von einer „noch nicht" cancerogenen „Muttersubstanz" spezifischer Grundstruktur zu hoch wirksamen krebserzeugenden Substanzen, wie dem 2-Anthramin oder dem 2-Aminofluoren (X), so daß die cancerogene Wirksamkeit als quantitatives Problem erscheint (vgl. hierzu die Bedeutung der B-Elektronendichte für die cancerogene Wirksamkeit[31]).

Es ist auffällig, daß die Muttersubstanzen der cancerogenen aromatischen Kohlenwasserstoffe wenigstens 3—4 aromatische Ringsysteme enthalten müssen, die Muttersubstanz der aromatischen Aminoverbindungen, nämlich das Anilin dagegen nur einen. Die Aminogruppe in Position 2 am aromatischen Ring hat also einen sehr starken „auxocancerogenen" Effekt, der wenigstens so stark zu sein scheint, wie der von 2 aromatischen Ringen. Diese wichtigen Beziehungen zwischen der chemischen Konstitution und der cancerogenen Wirksamkeit erlauben es, die zunächst sehr heterogen erscheinende Gesamtheit der cancerogenen Substanzen unter einem Gesichtspunkt zu ordnen[41] und führen zu experimentell prüfbaren Problemen.

Die cancerogenen aromatischen Amine unterscheiden sich weiterhin von den cancerogenen Kohlenwasserstoffen dadurch, daß sie auf Grund ihrer besseren Löslichkeit in Körperflüssigkeiten viel leichter resorbiert — aber auch leichter ausgeschieden — werden als diese. Sie haben daher eine *resorptive* cancerogene Wirkung, erzeugen Krebs in bestimmten inneren Organen („spezifische, organotrope Wirkung"), z. B. verursachen sie Leberkrebs, Blasenkrebs, Hypernephrome und andere Tumoren in so großer Mannigfaltigkeit, wie sie aus der Pathologie des menschlichen Krebs bekannt ist. Demgegenüber sind die aromatischen Kohlenwasserstoffe Substanzen mit *lokaler* cancerogener Wirkung.

Diese pharmakologischen Unterschiede zwischen den lokal und den resorptiv wirkenden cancerogenen Substanzen müssen bei der Prüfung einer Substanz auf cancerogene Wirkung naturgemäß berücksichtigt werden, wenn nicht ganz falsche Vorstellungen über ihre Wirksamkeit entstehen sollen. So würde z. B. das „Buttergelb" bei Applikation als Hautpinselung oder bei einmaliger subkutaner Injektion, wie diese bei der Untersuchung der lokal wirkenden Kohlenwasserstoffe üblich sind, unwirksam erscheinen, obwohl diese Substanz sicher cancerogen ist. Umgekehrt kann das lokal stark cancerogene 3 : 4 Benzpyren bei oraler Gabe ohne krebserzeugende Wirkung bleiben.

Das Anilin galt bisher als typisch „körperfremdes" Gift. Inzwischen haben aber neuere Forschungen ergeben, daß Anilin-Derivate nicht nur im Körper vorkommen, sondern auch von hoher biologischer Bedeutung sein können, wie z. B. die para-Anilin-Karbonsäure, die unter dem Namen: para-amino-Benzoesäure als verbreiteter Wuchsstoff und Vitamin H' bekannt geworden ist. Auch im Stoffwechsel des Tryptophans spielen Anilinderivate eine wichtige Rolle, wie z. B. das Kynurenin (BUTENANDT).

Aus diesem Grunde erscheint es besonders wichtig, daß das Anilin nach den vorliegenden Ergebnissen an Ratten keine irreversiblen Wirkungen hat, die Gefahr einer „chronischen Vergiftung" also nicht besteht.

Zusammenfassung.

1. Die Erkenntnis, daß der Krebs beim Menschen in der überwiegenden Mehrzahl durch „äußere Faktoren" verursacht sein muß, läßt die Suche nach solchen cancerogenen Faktoren in der täglichen Umwelt des Menschen als dringend wichtiges toxikologisches Problem erscheinen.

2. Der derzeitige Stand der Erkenntnis über den Wirkungsmechanismus cancerogener Substanzen wird dargestellt. Das Wesen der cancerogenen Wirkung liegt darin, daß jeder Einzeleffekt irreversibel ist und voll summationsfähig bestehen bleibt. Die Wirkung beruht nicht auf einem „Einzeltreffer Ereignis", sondern auf der Summation einer Vielzahl von Effekten. Angriffspunkt der Wirkung sind autoreproduktionsfähige Bestandteile der Zelle.

3. Die methodischen Voraussetzungen für die Prüfung solcher Substanzen auf cancerogene Wirkung und besonders auf Unschädlichkeit werden zusammengestellt.

4. Fütterungsversuche an Ratten ergaben, daß das reine Anilin hydrochlorid (FP = 199° C) keine cancerogene Wirkung hat.

5. Die Hämiglobin bildende Wirkung des Anilins bleibt auch bei dauernder Anwendung der Substanz über die ganze Lebenszeit der Ratte voll reversibel.

6. Die histologische Untersuchung der parenchymatösen Organe von dauernd mit Anilin behandelten Ratten ergab einen normalen Befund.

7. Die Sterblichkeitskurve der Versuchsratten weicht von der unbehandelter Kontrolltiere nicht ab.

8. Anilin hydrochlorid hat an Ratten bei einer täglichen Dosierung von 110—220 mg/kg keine erkennbaren irreversiblen Effekte. Eine „chronische Anilinvergiftung" gibt es danach an der Ratte nicht.

9. Die Hauptwirkungstypen von Pharmaka werden kurz aufgestellt. Die entscheidende Bestimmungsgröße ist die Zeitkonstante für die rückläufigen Vorgänge bei der Wirkung, also ihre Reversibilität. Das cancero-

gene Dimethylaminoazobenzol ist ein „ct Gift" im strengen Sinne, das Anilin erweist sich dagegen als ein reines „Konzentrationsgift".

10. Da das Anilin bzw. aus ihm entstehende „Giftungsprodukte" ausgesprochene Fermentgifte sind, reines Anilin aber keinen Krebs erzeugt, ist es unwahrscheinlich, daß die cancerogene Wirkung auf einer Vergiftung von Fermenten der bisher bekannten Art beruht, zumal letztere sich im allgemeinen durch volle Reversibilität auszeichnet, während die cancerogene Wirkung irreversibel ist.

11. Die Beziehungen zwischen der chemischen Konstitution und der cancerogenen Wirksamkeit der aromatischen Substanzen werden dargestellt.

Literatur.

Bittner, J. J.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **45**, 805 (1940). — Acta intern. Canc. **5**. 30 (1940). — Green, R. G., M. M. Mosey, and J. J. Bittner: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **61**, 115, 363 (1946). — [2] Bauer, K. H.: Das Krebsproblem. Heidelberg 1949. — Rehn, L.: Vrh. dtsch. Ges. f. Chir. **24**, 240 (1895). — [4] Druckrey, H.: Arch. f. exper. Path. **190**, 184 (1938). — Brock, N., H. Druckrey, u. H. Hamperl: Arh. f. exper. Path. **189**, 709 (1938). — Klin. Wschr. **1942**, 559. — Druckrey, H. u. Küpfmüller: Z. f. Naturforsch. **3** b, 254 (1948). — [5] Druckrey, H., u. K. Küpfmüller: Dosis und Wirkung. Berlin 1949. — [6] Strong, L. C.: Hered. **25**, 115 (1934). — [6a] Druckrey, H., Klin. Wschr., z. Zt. im Druck. — [7] Literatur siehe: Leuenberger, S. G. Beitr. klin. Chir. **80**, 208 (1912). — Müller, A.: Schweiz. med. Wschr. **1949**, 454. — [8] o-Toluidin und Benzdin: Morigami, S., u. I. Nisumura: Gann (jap.) **34**, 146 (1940). — Dittmar, C.: Z. Krebsforschg. **52**, 17 (1941). — Eckmann, B., u. J. P. Strömbeck: Acta physiol. scand. (Stockh.) **14**, 43, 63 (1947). — β-Naphtylamin: Cook, J. W., G. A. D. Haslewood, L. C. Hewett, J. Hieger, E. L. Kennaway u. Mayneord: 2. internat. Krebs-Kongr. 1936. — Hueper, W. C., F. H. Wiley, H. D. Wolfe, K. E. Rauta, M. F. Lenning, u. F. R. Blood: J. ind. Hyg. a. Toxicol. **29**, 40 (1938). — [9] Müller, A.: Schweiz. med. Wschr. **1949**, 445. — [10] Perlmann, S., u. W. Stähler: Z. urol. Chir. **36**, 139 (1932). — [11] White, F. R.: 4. internat. Krebs-Kongr. 1947, Chicago. — [12] Yamazaki, J., u. S. Sato: Jap. J. of Dermat. **42**, 332 (1937). — [13] Beerenblum u. Bonser: J. ind. Hyg. **19**, 86 (1937). — [14] Miller, J. A., u. E. C. Miller: J. of exper. Med. **87**, 139 (1948). — [15] Hinsberg, K.: Dtsch. med. Wschr. **1940**, 1074. — Riedel, H.: Klin. Wschr. **1942**, 569. — [16] Kensler, C. J., S. O. Dexter, C. P. Rhoads: J. of biol. Chem. **143**, 465 (1942). — [17] Kuhn, R., u. H. Beinert: Ber. dtsch. chem. Ges. **76**, 904 (1943); **77**, 606 (1944). — Chem. Ber. **80**, 101 (1947). — [18] Stoltzenberg u. Bergius: Z. Krebsforschg. **18** (1921). — [19] Takizawa, N.: Proc. imp. Acad. Tokyo **16**, 309 (1940). — Gann (jap.) **34**, 158 (1940). — [20] Kinosita, R.: Yale J. Biol. a. Med. **12**, 387 (1940). — [21] Zit. nach Cook, J. W.: Proc. Nutrit. Soc. **14**, 245 (1947). — [22] Takizawa, N.: Gann (jap.) **32**, 236 (1938); **33**, 193 (1939). — [23] Meier, R., u. M. Allgöwer: Experentia **3**, 358 (1947). — Meier, R., u. B. Schär: Experentia **1**, 57 (1945). — [24] Lehmann, F. E.: Experentia **3**, 273 (1947). — [25] Friedmann, E.: Brit. J. Pharmacol. **3**, 263 (1948). — [26] Klar, E.: Aromatische Kohlenwasserstoffe. Berlin 1941. — [27] Anderson, W.: Nature (Lond.) **160**, 892 (1947). — [28] Cook, J. W., u. R. H. Martin: J. chem. Soc. Lond. **1940**, 1125. — [29] Iball, J.: Amer. J. Canc. **38**, 372 (1940). — [30] Schmidt, O.: Naturwiss. **29**, 147 (1941. — [31] Boyland, E.: 4. internat. Krebs-Kongr. 1947. — [32] Shear,

M. J.: Amer. J. Canc. **36**, 211 (1939). — Maisin, J., u. A. de Jonghe: C. r. Soc. Biol. Paris **117**, 111 (1934). [33] Nagao, N.: Gann (jap.) **34**, 13 (1940). — [34] Rondoni, P., u. W. Beltrami: Enzymologia **3**, 252 (1937). — [35] Heubner, W.: Erg. Physiol. usw. **43**, 9 (1940). — [36] Heubner, W., u. M. Stuhlmann: Arch. exper. Path, u. Pharmakol. **199**, 1 (1942). — [37] Druckrey, H., u. K. Küpfmüller: Z. Naturforsch. **3b**, 254 (1948). — [38] Druckrey, H., u. K. Küpfmüller: Dosis und Wirkung. Berlin 1949. — [39] Heubner, W.: Schweiz. med. Wschr. **1937**, 45. — [40] Havemann, R., F. Jung, u. v. Issekutz: Biochem. Z. **301**, 105 (1936). — [41] Druckrey H., P. Danneberg u. D. Schmähl Zschr. f. Naturforschg. 5[b] (1950) — Druckrey H., Klin. Wschr., z. Zt. i Druck.

Prof. Dr. Hermann Druckrey, (17b) Freiburg, Chirurg. Univ.-Klinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 159—164 (1950).

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Bonn.

Ein Verfahren zur Untersuchung der Pharmakologie der Schweißdrüsen des Menschen.

Von

RUDOLF KADATZ.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 5. Oktober 1949.)

Bei dem Bestreben, ein Verfahren zur Untersuchung der pharmakologischen Beeinflussung der Schweißdrüsentätigkeit beim Menschen zu ermitteln, fanden wir in der Literatur keine geeignete Methode, die in wünschenswerter Einfachheit und Genauigkeit eine vergleichende Prüfung verschiedener Substanzen durchzuführen erlaubte. Wir haben daher eine eigene Methode entwickelt, die im folgenden beschrieben wird, und haben damit die Schweißsekretionshemmung von Atropin mit der eines neuen Skopolaminderivates verglichen.

Bei den üblichen älteren Verfahren wurde das Pharmakon per os oder per injectionem appliziert und dann der ausgeschiedene Schweiß entweder insgesamt oder nur von einer Extremität in einem Versuchskasten oder in einem Gummisack aufgefangen und gemessen (JANSSEN[1], BRIEGER und DISSELHORST[2], WILLEBRAND[3]). SCHWENKENBECHER[4] bestimmte die Wasserdampfabgabe der in einem Kasten eingeschlossenen Versuchsperson mittels Haarhygrometer, CRAMER[5] errechnete die abgegebene Schweißmenge aus dem NaCl-Gehalt der Unterwäsche. — Bei diesem Vorgehen nimmt man einmal die Unannehmlichkeit in Kauf, daß die Nebenwirkungen der Substanzen auf das Herz, auf die Speichelsekretion und auf den Magen-Darmkanal erheblich sein können und die Versuchsperson belästigen, zum anderen ist aber auch ein Vergleich verschiedener Substanzen dadurch erschwert, daß eine gleichzeitige Applikation mehrerer Stoffe hierbei nicht möglich ist sondern mit einem 2. Versuch gewartet werden muß, bis die Wirkung des 1. vollständig abgeklungen ist. Da nun die Schweißdrüsenfunktion vielfachen und zum Teil unübersichtlichen Beeinflussungen unterliegt, wie z. B. der Steuerung im Dienste von Wärme-, Wasser- und Salzhaushalt, ferner von psychischen Einflüssen (Erwartung, Aufregung, Angst usw.) und von der Zeit nach der letzten Nahrungsaufnahme abhängig ist, und da alle diese Faktoren von einem Versuch zum anderen sich verändern können, werden also bei nicht gleichzeitigen Versuchen nur sehr grob oder gar nicht vergleichbare Ergebnisse zu erwarten sein. Dazu kommt noch, daß nach GOLDSCHEIDER[6] bei wiederholten gleichartigen Schwitzprozeduren

Veränderungen sowohl der Schweißmenge als auch des zeitlichen Verlaufs der Sekretion zu beobachten sind, die er als eine Gewöhnung oder Anpassung des Organismus deutet.

Die gleichen Schwierigkeiten bestehen, wenn man die Schweißsekretion nach dem Verfahren von Jürgensen[7] untersucht, der mit dem Hautmikroskop die an den Papillenleisten der Hand austretenden Schweißtröpfchen beobachtete, oder wenn man den Hautwiderstand mißt, der nach Leva[8] von der Schweißdrüsentätigkeit abhängt und dessen Schwankungen (als psychogalvanisches Phänomen nach Veragouth) besonders eindrucksvoll die fortwährende psychische Beeinflussung der Schweißabscheidung erkennen lassen.

Eine vergleichende Untersuchung mehrerer Mittel erfordert also gleichzeitige Applikation an benachbarten Hautstellen, an denen ein gleichartiges Verhalten der Schweißdrüsen während der Versuchsdauer zu erwarten ist. Dabei muß, um eine Allgemeinwirkung nach Resorption zu verhindern, die eingeführte Menge möglichst gering sein. Diese Bedingungen erscheinen am ehesten erfüllt bei elektrophoretischer Einführung der Substanzen in die Haut, einem Verfahren, das seit langem in wechselnder Technik üblich ist und das in der von Ebbecke mittels Flüssigkeitselektroden modifizierten Weise von uns unlängst beschrieben wurde (Kadatz[9]). Die als Elektroden auf die Haut aufgesetzten Glasröhrchen hatten einen Durchmesser von 16 mm. Sie wurden mit der in Aqua dest. gelösten zu testenden Substanz gefüllt. In die Lösung hinein tauchte eine unpolarisierbare Zink-Zinksulfatelektrode, während als indifferente Elektrode ein Messingzylinder breitflächig von der ganzen Hand umfaßt wurde. Da die untersuchten Stoffe dissoziieren und dann negativ geladen sind, wurden sie von der Anode als differenter Elektrode her in die Haut eingebracht. Die Stromstärke von 2 mA wurde bei einer Spannung von 30—40 Volt erzielt, die Durchströmungszeit betrug 1 bis 2 min.

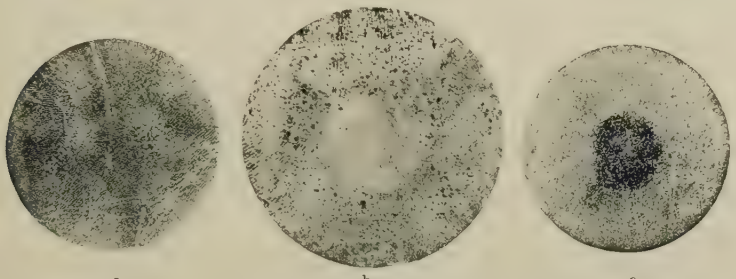
Gerade für die Beeinflussung der Schweißdrüsen erscheint dieses Verfahren besonder geeignet, weil die die Epidermis durchdringenden Drüsenausführungsgänge den wichtigsten Einwanderungsweg der durch den elektrischen Strom transportierten Moleküle bzw. Ionen darstellen. Die derart in die Haut eingebrachte Substanzmenge ist so gering, daß ihre Wirkung streng auf den Hautbezirk beschränkt bleibt, dem die Flüssigkeitselektrode auflag.

Zu solcher lokalen Anwendung von schweißdrüsenwirksamen Pharmaka sind wir berechtigt, sofern sicher erwiesen ist, daß ihr Angriffspunkt in der Peripherie liegt. Das trifft für die wichtigsten von ihnen, Atropin und Pilokarpin zu. Sie wirken entweder auf die peripheren Nervenendigungen oder auf die Drüsenzellen selbst, wo beide sich als echte Antagonisten erweisen (Metzner[10], Schwenkenbecher[11]).

Die Innervation der Schweißdrüsen erfolgt beim Menschen durch sympathische Fasern, die vom Grenzstrang aus mit den gemischten Nerven zur Peripherie ziehen.

Ihrem pharmakologischem Verhalten nach sind diese Nerven cholinergisch, denn die Schweißsekretion wird durch Pilokarpin und Azetylcholin gefördert und durch Atropin gehemmt.

Die der elektrophoretischen Einführung der Substanzen folgende Untersuchung der Schweißdrüsentätigkeit führten wir in Anlehnung an ein von P. AUBERT (zit. nach METZNER[10]) angegebenes Verfahren durch, das dieser zum Nachweis der Perspiratio insensibilis anwandte: Auf der Stelle der Haut, der die Elektrode aufgelegen hatte, wird nach sorgfältiger Reinigung ein Stück glattes Filtrierpapier von etwa 5 cm Durchmesser befestigt, das die austretenden Schweißtröpfchen aufsaugt. Entfernt man das Papier nach einigen Minuten, tränkt es kurz in einer 0,5% Lösung von Argent. nitric. und bringt es danach ins Sonnenlicht, so entwickeln sich rasch neben einer leichten bräunlichen Tönung des ganzen Papiers infolge des Cl-Gehalts des Schweißes kleine schwarzbraune Pünktchen von reduziertem Chlorsilber, die den aus den einzelnen Drüsen ausgetretenen Schweißtropfen entsprechen.



a b c

Abb. 1. Schweißsekretion der menschlichen Haut. Der Schweiß wird durch ein der Haut fest aufliegendes Stück Filtrierpapier aufgesaugt und nach Tränken des Filtrierpapiers mit Argent. nitric. durch Entwickeln von AgCl im Licht sichtbar gemacht. a) Bild der Schweißtröpfchen der unbehandelten Handfläche. b) Anhidrosis nach Behandlung der gleichen Hautstelle durch elektrophoretische Applikation von Atropin 1 : 10000, 2 mA, 1 min. c) Hyperhidrosis am Unterarm nach Anwendung von Pilocarpin 1 : 10000 2 mA, 1 min.

Durch eine Kombination der elektrophoretischen Applikation mit dem Schweißnachweis auf Filtrierpapier mit Argent. nitric. wird nun die Wirkung von Atropin und Pilokarpin untersucht. Nach Anwendung von Atropin bleiben im Elektrodenbereich die Schweißpünktchen fort, nach Pilokarpin sind sie vermehrt, vergrößert und konfluieren miteinander.

Wiederholt man diese Abzüge mehrmals, so kann man auch den zeitlichen Verlauf der Sekretionsbeeinflussung fast für jede Schweißdrüse einzeln verfolgen und festhalten. Es erwies sich als ausreichend, die Abzüge in Abständen von einer halben Stunde etwa 3 Std lang herzustellen, um sich ein genügendes Bild von Wirkungsstärke und -dauer von Pilokarpin und Atropin zu machen. Die Abzüge können während des Versuchs gesammelt und am Schluß zusammen entwickelt werden, sie

sind lange haltbar, dunkeln aber, dem Licht ausgesetzt, mit der Zeit etwas nach.

Grundsätzlich wäre ein Sichtbarmachen der pharmakologisch veränderten Schweißdrüsentätigkeit auch möglich nach der Methode von Ken Kurè und Mitarbeitern[12], die die zu untersuchende Hautstelle mit Jodtinktur anstrichen und nach Trocknen mit Stärke bepuderten. Schwitzende Hautpartien färben sich blau. Abgesehen davon aber, daß eine Fixierung der Ergebnisse dann nur fotografisch möglich wäre, ist auch ein genaueres Verfolgen der zeitlichen Verhältnisse der Sekretionsbeeinflussung dabei kaum möglich.

Die differente Elektrode wurde entweder an der Beugeseite des Unterarmes oder an der Handfläche mit ihren besonders dicht stehenden Schweißdrüsen (300—400 cm^2) aufgesetzt. Dabei besteht ein wichtiger Unterschied zwischen diesen beiden Hautstellen insofern, als eine Förderung der Schweißsekretion durch Pilokarpin nur am Arm, nicht aber an der Handinnenfläche festzustellen war, während eine Hemmung durch Atropin an Hand und Arm in gleicher Weise auftritt. Auch die übrigen sekretionssteigernden Mittel, nämlich Azetylcholin und Eserin wirkten wohl an der Haut des Unterarmes, nicht dagegen aber an der Hand.

Die schweißsekretionshemmende Wirkung des Atropins setzt merkwürdigerweise erst 15—20 min nach Beginn der elektrophoretischen Applikation ein und hält dann für 2—3 Std an. Es vergeht also eine überraschend lange Zeit bis zum Sichtbarwerden der Wirkung. Ebenso lange, 20 min, hält nach Luchsinger[13] auch die Schweißsekretion nach Unterbrechung der Hautdurchblutung an. Wir vermuten deshalb, daß es sich in beiden Fällen während dieser Zeit nicht um eine echte Neubildung sondern nur noch um die Ausscheidung von in den Ausführungsgängen gewissermaßen „auf Vorrat“ vorhandenen Schweisses durch Kontraktion glatter Muskelfasern in der Wand der Schweißdrüsen handelt. Diese Annahme einer aktiven Austreibung des Schweißdrüseninhaltes wird durch Beobachtungen von Jürgensen[7] unterstützt, der mit dem Hautmikroskop plötzliche „ruckartige“ Entleerung von Schweißtröpfchen sah. Auch die genaue Betrachtung schwitzender Hautpartien in der Sonne läßt nach einer unveröffentlichten Beobachtung von Ebbecke an dem feinen hier und da sichtbaren plötzlichen Aufglänzen feinster Tröpfchen diese Wirkung erkennen. Der Austreibungsmechanismus könnte vom eigentlichen Sekretionsvorgang unabhängig sein und auch einige Zeit nach dessen Sistieren noch funktionsfähig bleiben.

Leider ist diese Deutung nicht völlig befriedigend. Schweißproduktion und Schweißdrüsenentleerung dienen ja gleichermaßen dem Vorgang des Schwitzens, und man scheut sich, ein unterschiedliches pharmakologisches Verhalten der beiden Teilvorgänge anzunehmen. Man sollte eher eine Lähmung auch der glatten Muskelzellen der Schweißdrüsenwand

durch Atropin vermuten. — Andererseits ist die Beobachtung als solche durch eine Reihe von Versuchen gesichert. Andere denkbare Erklärungen, nämlich daß entweder das Atropin eine so lange Zeit für den Weg von der Hautoberfläche bis in die Tiefe der Schweißdrüsen braucht oder daß es, obwohl bereits am Wirkungsort angekommen, dort erst nach etwa 15 min seine Wirkung entfaltet, haben noch weniger Wahrscheinlichkeit für sich. Auch sind keine analoge Beobachtungen einer ähnlich langen Latenzzeit der Atropinwirkung an anderen Organen bekannt. So sehen wir keinen anderen Weg, als die oben genannte Deutung zur Hilfe zu nehmen.

Vergleich der Wirkung von Buskopin und Atropin.

Buskopin ist ein quarternäres Scopolaminderivat, das in den Laboratorien der Firma C. H. Boehringer/Ingelheim entwickelt worden ist. Seine pharmakologischen Wirkungen sind denen des Atropins sehr ähnlich in Bezug auf den hemmenden Effekt an Magen und Darm, während die Nebenwirkungen z. B. auf die Speichelsekretion erheblich geringer sind. Zum Vergleich damit verwandten wir Atropin sulf. crist. „Merck".

Buskopin wirkt wie Atropin schweißhemmend, was auf den Abzügen als eine der Elektrodengröße entsprechende ausgesparte Stelle zu erkennen ist. Die Wirkungsschwelle ist abhängig von Stromstärke und Durchströmungszeit, bei den in den meisten Versuchen eingehaltenen Daten von 2 mA und 5 min lag sie an der Handinnenfläche für Atropin bei 1 : 200000 und für Buskopin bei 1 : 100. Im Bereich eben unterschwelliger Konzentrationen erstreckt sich die schweißhemmende Wirkung nicht gleichmäßig auf alle Drüsen, sondern es wird nur ein Teil ganz stillgestellt, während andere noch kleine Tröpfchen ausscheiden, die im Abzug als weniger dicht stehende kleinere Pünktchen erscheinen. Durch stärkere Konzentrationen tritt dann eine vollständige lokale Schweißsekretions-Hemmung ein.

Die einer Buskopinlösung von 1 : 25 wirkungsgleiche Atropinkonzentration war 1 : 15000 — 1 : 50000, es besteht also in Bezug auf den antihidrotischen Effekt beim Menschen ein Wirkungsverhältnis von Buskopin : Atropin = 1 : 1000 — 1 : 2000. Im Bereich dieser wirkungsgleichen Konzentrationen wurde die lange Latenzzeit von 15—20 min auch beim Buskopin genau wie beim Atropin gefunden.

Zusammenfassung.

Es wird ein neues Verfahren zur vergleichenden Untersuchung der pharmakologischen Beeinflussung der Schweißsekretion beim Menschen beschrieben. Die zu untersuchende Substanz wird durch Elektrophorese

in die Haut der Palma manus oder des Unterarmes eingebracht und danach die Schweißsekretion durch Aufsaugen der Schweißtröpfchen auf Fließpapier und Sichtbarmachen mittels einer photochemischen Reaktion bestimmt. Der Vergleich der antihidrotischen Wirkung von Buskopin und Atropin an Unterarm und Hand ergibt ein Wirkungsverhältnis von etwa 1 : 1000. Die schweißfördernde Wirkung von Pilokarpin, Azetylcholin und Eserin ist am Arm deutlich, fehlt dagegen völlig an der Handinnenfläche.

Literatur.

[1] Janssen: Dtsch. Arch. klin. Med. **33**, 334 (1883). — [2] Brieger, L., u. G. Disselhorst: Dtsch. med. Wschr. **1903**, 167. — [3] Willebrand, E. v.: Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **13**, 337 (1902). — [4] Schwenkenbecher: Dtsch. Arch. klin. Med. **79**, 56 (1903). — [5] Cramer: Arch. f. Hyg. **10**, 231 (1890). — [6] Goldscheider: Münch. med. Wschr. **1906**, 2557. — [7] Jürgensen, E.: Dtsch. Arch. klin. Med. **144**, 193 (1924). — [8] Leva, J.: Münch. med Wschr. **1913**, 2386. — [9] Kadatz, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 363 (1949). — [10] Metzner: Nagels Handb. d. Physiol., Bd. II/1, S. 401. Braunschweig: Vieweg & Sohn 1906. — [11] Schwenkenbecher: Handb. norm. path. Physiol., Bd. IV, S. 719. Berlin: Springer 1929. — [12] Ken Kuré, Shigeo Okinaka, Shuzo Maéda u. Hajima Kato: Pflügers Arch. **237**, 40 (1936). — [13] Luchsinger, B.: Hermanns Handb. d. Physiol., Bd. 5/1, S. 421. Leipzig: F. C. W. Vogel 1880.

Dr. Rudolf Kadatz, Bonn, Physiolog. Institut.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 165—174 (1950).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Leipzig.

Die Blutungszeit und ihre Beeinflussung durch Hämostyptika.

Von

Friedrich Hohensee.

(Eingegangen am 12. Oktober 1949.)

Der Begriff der Blutungszeit — von Duke[1] eingeführt — hat sich als ein brauchbarer Anhaltspunkt zur Berücksichtigung aller jener Faktoren gezeigt, die, von der Blutgerinnung unabhängig, die Blutung aus einer Wunde dennoch beeinflussen können. Spätere Untersuchungen[2, 3, 4] bestätigen, daß beide Vorgänge — die Blutgerinnung und die Blutungszeit aus einer Wunde — manchmal nicht gleichsinnig verlaufen. Klinischerseits wird diese Tatsache besonders bei Purpuraerkrankungen beobachtet, wo verlängerte und gehäufte Blutungen bei normaler oder sogar verkürzter Blutungszeit auftraten.[5].

Roskam[2] untersuchte die Blutungszeit tierexperimentell genauer dadurch, daß er die Dauer der Blutung aus Wunden am Hundeohr maß. Im weiteren Verfolg dieser Studien gingen Roskam u. Mitarb.[6, 7, 8] dazu über, ihre Versuche an Kaninchen fortzusetzen. Die Streuung der dabei erhaltenen Werte veranlaßte Roskam, den Begriff der mittleren Blutungszeit, bezogen auf sein untersuchtes Tierkollektiv, in Anwendung zu bringen. Die so gefundenen Mittelwerte bildeten die Grundlage seiner Versuche[9] über die Beeinflussung der Blutungszeit durch blutstillende Mittel. Neuerdings wurde von Fleisch u. Mitarb.[10, 11, 12] diese Frage abermals aufgegriffen. In systematischen Untersuchungen an einem großen Tiermaterial und nach einwandfreier statistischer Auswertung der dabei erhaltenen Befunde konnten die Verff. zeigen, daß die Blutungszeit keine feste Größe ist. Wenn einem Tier eine Wunde beigebracht worden war — und es genügte dazu der kleine Schnitt, der zur Messung der Blutungszeit gesetzt werden mußte —, konnte eine auch statistisch gesicherte Verkürzung der Blutungszeit aus einer zweiten nach einem gewissen Zeitintervall gesetzten Wunde gefunden werden. Diese Erscheinung — von Fleisch als posttraumatische Blutungsverkürzung (posttr. Bvk.) bezeichnet — ließ die bisher erhobenen Befunde über die Wirksamkeit von Hämostatika in einem zweifelhaften Licht erscheinen, denn bei genauer Betrachtung der darüber angestellten Versuche[9] muß man feststellen, daß bislang die Versuchsbedingungen so gewählt waren, daß die Wirkungen, die den angewendeten Pharmaka zugeschrieben wurden, im zeitlichen Bereich der posttr. Bvk. liegen. Im weiteren Verfolg dieser Ergebnisse untersuchte Fleisch nun die Wirkung eines Hämostatikums (Adrenalon = Methylaminoazetobrenzkatechin — Chlorhydrat = Stryphnon) am Kaninchen unter Bedingungen, welche den Einfluß der posttr. Bvk. ausschließen. Es ergab sich dabei, daß zu einer sicheren Wirkung von Hämostatika viel größere Dosen notwendig sind, als nach den früheren Untersuchungen angenommen werden mußte. Ferner zeigte sich,

daß die Wirkung dieses Mittels flüchtig ist und daß sich der pharmakologische Effekt des Stryphnon zur physiologischen Erscheinung der posttr. Bvk. nicht additiv, sondern sogar unteradditiv verhält. FLEISCH und TRIPOD glauben sich daher berechtigt, die Frage aufzuwerfen, „ob die Einspritzung von einem solchen Hämostatikum in der Chirurgie überhaupt von Nutzen sein kann."

Der Einführung des *Manetol* durch die IG-Farben-Industrie Werk Elberfeld folgte eine Mitteilung der Erfinder dieses Mittels, in der DÖTTL und RIPKE[13] einige methodische Einzelheiten, welche die tierexperimentellen Grundlagen bei der Entwicklung dieses Präparates umreißen, angeben. Als Versuchstiere dienten hier weiße Mäuse, bei denen durch 2 Nadelstiche in die Schwanzvene blutende Wunden erzeugt wurden. Die Blutungszeit wurde vor und nach der Applikation des *Manetols* gemessen. Eine Berücksichtigung der posttr. Bvk. konnte natürlich bei diesen Untersuchungen noch nicht erfolgen, da die Einführung des *Manetol* lange vor der Kenntnis des Verlaufs der physiologischen Blutungsregulation[10] stattfand. Allerdings scheinen auch die mitgeteilten Untersuchungen an einem recht kleinen Tiermaterial gewonnen zu sein.

Die wichtige Frage, ob der Einsatz von Hämostatika überhaupt eine reale pharmakologische Grundlage hat, dazu der Umstand, daß solche Mittel in der Klinik und Praxis eine ausgedehnte Verwendung finden, ferner die Tatsache, daß zur Pharmakodynamie dieser Stoffe nur wenige experimentelle Grundlagen vorhanden sind, gaben die Veranlassung, diesen Fragenkomplex noch einmal aufzuwerfen.

Als Versuchsmaterial wählten wir weiße Mäuse. Die mit geringeren Kosten auch gegenwärtig beschaffbaren Tiere gestatten den Ansatz von Versuchsserien, die groß genug sind, und durch einwandfreie statistische Bearbeitung zu Werten zu kommen, die mit den Zahlen von FLEISCH und TRIPOD[10] vergleichbar sind. Die Fragestellung der hier vorgelegten Arbeit läßt sich wie folgt umreißen: 1. Eignet sich die weiße Maus als Versuchstier zur Bestimmung der mittleren Blutungszeit? Tritt die posttr. Bvk. auch bei Mäusen auf und wo sind die Ursachen dafür zu suchen? Ist eine Beeinflussung der Blutungszeit durch die untersuchten Hämostatika möglich? 2. Untersuchungen zur Deutung der Wirkung von Hämostatika.

Zur Methodik.

Unsere Versuche wurden an über 300 weißen Mäusen vorgenommen, an denen wir über 1000 Blutungszeiten gemessen haben. Um ein gleichmäßiges Ausgangsmaterial zu haben, fanden nur männliche Tiere mit einem Gewicht von 15,0—26,0 g Verwendung. Die Tiere wurden veranlaßt, in ein körpergerecht großes Loch eines Holzblocks einzukriechen. Durch eine durchbohrte Verschlußplatte der Einschlupföffnung konnte der Schwanz ohne Bewegungshinderung oder Stauung heraushängen. Ein beweglicher Stempel mit Luftlöchern am Kopfende diente dazu, das Tier so zu fixieren, daß das Hinterteil fest an die Verschlußplatte gepreßt wurde; Schwanzbewegungen wurden dadurch unmöglich. Die Tiere blieben ohne Betäubung. Mit einem scharfen kleinen Skalpell wurde in der Verlaufsrichtung der Schwanzvenen über dem Gefäß ein etwa 1,5 mm langer Schnitt so tief geführt, daß das Gefäß eben eröffnet wurde. Dies wurde durch den sofort heraustretenden Bluttropfen sichtbar. Alle Schnitte wurden stets von derselben Person angelegt. Dadurch gelang es bald,

die notwendige Routine und Gleichmäßigkeit in der Schnittführung zu erzielen, auf deren Notwendigkeit schon von anderer Seite[10] hingewiesen wurde. Der blutende Schwanz wurde in ein Gefäß mit 50 cm³ körperwarmer (38° C) 0,9%iger NaCl-Lösung gehalten, und die Zeit bis zum Abriß des gut sichtbar aus der Wunde fließenden Blutfadens mit der Stoppuhr gemessen. Das p_H der aus bidest. Wasser hergestellten Kochsalzlösung war auf 7,4 eingestellt. Die Blutmenge, die von jedem Tier verloren wurde, bestimmten wir im lichtelektrischen Havemann-Kolorimeter dadurch, daß wir die Extinktion der unbekannten Blutkonzentration mit Werten verglichen, die wir mit durch Herzpunktion gewonnenem Mäuseblut bekannter Konzentration erhalten hatten. Die Zahlen werteten wir nach den Regeln der Variationsstatistik aus[14]. Als Hämostatika fanden die Organextrakte aus dem Rückenmark, hergestellt von den Firmen „Bayer" Elberfeld (*Manetol*) und „Wecusta-Werke" Dresden *(Styptan)* Verwendung*. Die Versuche wurden in der Zeit vom Mai bis August 1949 durchgeführt. Zum zweiten Versuch wurden die Tiere frühestens nach einer Pause von 10 Tagen verwendet. Der Inhalt der handelsüblichen 1 cm³ enthaltenden Ampullen der Originalpackungen wurde als 1 g Substanz angesehen, alle angegebenen Verdünnungen wurden darauf bezogen.

Die normale Blutungszeit und die posttraumatische Blutungsverkürzung.

Die Ergebnisse der Untersuchungen von Fleisch und Tripod[10], welche an Kaninchen gewonnen wurden, zeigen, daß durch die posttr. Bvk. ein Regulationsmechanismus vorhanden ist, der physiologisch dann einsetzt, wenn durch eine Wunde eine Irritation im Blutgefäßsystem entsteht. Es scheint von großer Bedeutung, zu erfahren, ob es sich bei diesem Vorgang um ein allgemeines biologisches Prinzip handelt. Wäre doch durch die genauere Kenntnis dieser Umstände die Vermutung realisiert, daß der Körper von sich aus alles tut, um nach einer erfolgten Verletzung die Normalisierung des gestörten Gleichgewichts schnell wieder herzustellen. Eingriffe in diesen Regulationsvorgang könnten also nur nachteilig sein — die Applikation eines Hämostatikums ist nach Fleisch auch als solcher anzusehen, und seine Unzweckmäßigkeit in den Ergebnissen seiner Untersuchungen über die Wirkung derselben aufgezeigt[10]. In sehr sorgfältigen Untersuchungen, die der 1. Mitteilung von Fleisch folgten[11, 12], wurde der Frage nachgegangen, ob andere Faktoren die Ursache für dieses Verhalten sein könnten (Narkose, Ionenmilieu der Spülflüssigkeit, lokale Gefäßnervenregulation, Lokalisation der Wunde und zentrale vegetative Steuerung). Ein wesentlicher Einfluß dieser Umstände auf die posttr. Bvk. konnte ausgeschlossen werden. Offen bleibt noch die Frage, ob es sich um ein artspezifisches Verhalten der Versuchstiere handelt, oder ob es gelingt, ein allgemeines Prinzip aus diesen Ergebnissen abzuleiten. Dieser Umstand bestimmt die Wahl unserer Versuchstiere und es ergab sich, daß die posttr. Bvk. in so großem Ausmaß eine Arteigentümlichkeit von Kaninchen ist.

* Die Versuchsmengen wurden mir von den „Wecusta-Werken", Dresden zur Verfügung gestellt. Es ist mir eine angenehme Pflicht, den Wecusta-Werken auch für die weitere Unterstützung der Untersuchungen zu danken.

In der Tab. 1 sind die Ergebnisse der Versuche zur Bestimmung der normalen Blutungszeit und der posttr. Bvk. dargestellt. Es ergibt sich, daß ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Reihen nicht besteht. Die Anwendung des Differenzkriteriums zeigt einen Wert <1, also fallen die Unterschiede in den Bereich der normalen Streuung. Auch ist die Zahl der Versuche groß genug, um eine derartige Aussage machen zu können.

Tabelle 1.

Zahl der Mäuse	Blutungszeit I Mittelwert m_1		Zahl der Mäuse	Blutungszeit II 60 min nach I Mittelwert m_2		Zahl der Mäuse	Blutungszeit III 120 min nach I Mittelwert m_3	
n_1	sec	$\sigma \pm$	n_2	sec	$\sigma \pm$	n_3	sec	$\sigma \pm$
380	102	34	126	91	29	132	89	38

Differenzkriterium berechnet nach: $\xi = \frac{d}{3\mu_D}$

$m_1 : m_2 = < 1 \qquad m_1 : m_3 = < 1$

Es sollen nun kritisch die Umstände erörtert werden, die den hier aufgezeigten Tatbestand unter Umständen beeinflussen könnten, um zu vermeiden, daß äußere Momente, die in der angewandten Versuchsanordnung ihre Ursache haben, die posttr. Bvk. verschleiern. Zu diskutieren ist in diesem Zusammenhang die Größe des Blutverlustes. Der mittlere Blutverlust betrug 1,25 g/kg (mittlerer Blutverlust je Tier 0,025 g $\pm$ 0,012 g; mittleres Tiergewicht 20,5 g $\pm$ 4 g). Der Größe des Blutverlustes ist auch von FLEISCH und TRIPOD Aufmerksamkeit geschenkt worden, die in ihren Untersuchungen einen Verlust von 0,5 cm^3/kg sicher noch ohne Einfluß auf die posttr. Bvk. fanden. Bei der hier angewandten Methodik war es nicht möglich — ohne eine relativ viel größere Verschlechterung der Ergebnisse durch einen größeren technischen Fehler zu erhalten — die gesetzte Wunde zu verkleinern.

Dieser mögliche Einwand gegen die Vergleichung der hier vorgelegten Ergebnisse mit den Befunden von FLEISCH und TRIPOD scheint tragbar unter Berücksichtigung der Ergebnisse anderer Autoren, die bei Untersuchungen ganz anderer Fragestellungen die Behauptung der arteigentümlichen posttr. Bvk. an Kaninchen stützen. Die Richtung dieser Überlegungen wurde von FLEISCH und POSTERNAK schon in einer Änderung des Blutchemismus angedeutet.

Durch die Untersuchungen von STROMBERG[15] und in den neuen Befunden von DYCKERHOFF u. a.[16, 17, 18] wird der Zusammenhang zwischen Blutungszeit und der Gerinnungsfähigkeit aufgezeigt. Dieser Zusammenhang ist im physiologischen Bereich immer allgemein anerkannt worden. Man sollte diesem Umstand Rechnung tragen und die Trennung dieser Faktoren nur bei pathologischen Verhältnissen vornehmen. Es wird durch diese Untersuchungen deutlich, daß die Blutgerinnung nach einer geringfügigen Verletzung so verkürzt wird, daß blutungsverkürzende Wirkungen von Pharmaka an Kaninchen nicht nachgewiesen werden können. Analog zu FLEISCH könnte man hier also von einer posttraumatischen Gerinnungsverkürzung sprechen.

Beim Menschen und Meerschweinchen scheint dieser Zusammenhang nicht in diesem Umfang zu bestehen. Sollten sich die dabei gefundenen Werte[17] an größerem Versuchsmaterial bestätigen lassen, so wäre sehr zu empfehlen die Versuchstiere zur Wertbestimmung von Hämostatika zu wechseln, und mit Mäusen oder Meerschweinchen weiterzuarbeiten. Erwähnt sei die Tatsache, daß bei der Hämophilie nach einer starken Blutung sowohl die Blutungszeit als auch die Gerinnungszeit gegenüber der (hier allerdings pathologisch veränderten) Norm verkürzt ist.

Die Wirkung von Hämostatika.

Die Beeinflussung der Blutungszeit durch Hämostatika wird in der Tab. 2 dargestellt. Ein signifikanter Unterschied ergibt sich erst bei der hohen Dosierung von 10 g/kg. Diese großen Dosen, die zu einer deutlichen Beeinflussung der Blutungszeit notwendig sind, lassen die Wirksamkeit von Hämostatika abermals in zweifelhaftem Licht erscheinen. Scheinbar werden die Befunde von Fleisch bestätigt, daß, um einen gesicherten Effekt zu erzielen, sehr viel größere Dosen notwendig sind, als die ältere Literatur[6, 7, 8] angibt. Daß alle diese Angaben in der bislang ausgesprochenen Form nicht zutreffend sind, liegt an der bisher verwendeten unzweckmäßigen Versuchsanordnung, die *allein* über das Ausmaß der Wirkung nur ungenügende Aufschlüsse gibt. Einzelheiten darüber werden im nächsten Abschnitt dargestellt.

Tabelle 2.

Zahl der Mäuse	Blutungszeit (normal) = Mittelwert m_1		Zahl der Mäuse	Blutungszeit 24 Std n. 10 g/kg Manetol = Mittelwert m_2		Zahl der Mäuse	Blutungszeit 24 Std n. 10 g/kg Styptan = Mittelwert m_3	
n_1	sec	$\sigma \pm$	n_2	sec	$\sigma \pm$	n_3	sec	$\sigma \pm$
380	102	34	132	78	28	102	77	26

Berechnung des Differenzkriteriums siehe Tab. 1.

$m_1 : m_2 = > 1 \qquad m_1 : m_3 = > 1$

Erwähnt sei nur noch die Untersuchung von Derouaux[19], wo der Verf. mit Recht die Angaben von Döttl und Ripke[13] nachrechnet und das *Manetol* ablehnt mit der Begründung, daß die erforderliche hohe Dosierung im Tierversuch in einem krassen Gegensatz zu den Angaben über die klinische Dosierung steht. Weiter wird der Einfluß auf die Blutungszeit untersucht und keine Wirkung gefunden. Ähnlich sind die Ergebnisse von Baumann[20]. Er berichtet — allerdings an wenig umfangreichen klinischen Untersuchungen —, keinen Einfluß des *Manetol* auf die Blutungszeit gefunden zu haben.

Zum Angriffspunkt der Hämostatika.

Der Angriffspunkt dieser Präparate war naturgemäß im Gefäßsystem zu suchen. Es wurden daher Untersuchungen in dieser Richtung angestellt, wobei es weniger darauf ankam, überhaupt eine unspezifische

Wirkung zu finden, als quantitativ spezifische Wirkungen zu beobachten, die im therapeutischen Bereich der verwendeten Pharmaka liegen und erlauben, eine Brücke von den zum Teil enthusiasmierten klinischen Berichten zu den experimentellen Befunden zu schlagen, ein Vorgehen, das in diesem Falle notwendig erscheint, da die hier vorliegenden Pharmaka schon lange im Handel sind, ohne daß genügende Untersuchungen darüber vorliegen, ob ihre Anwendung rationell zu begründen ist.

Einleitend soll kurz die *Toxizität* der untersuchten Präparate *Manetol* und *Styptan* dargestellt werden. Erwartungsgemäß zeigten diese aus dem Rückenmark gewonnenen Organextrakte bei parenteraler Zufuhr nur geringe Eigenwirkung. Die tödliche Grenzkonzentration bei Injektionen in den Bauchlymphsack von R. esculenta lag bei 50—100 g/kg. Bei subkutaner Injektion an Ratten und Mäusen waren 100 g/kg tödlich. Die geringe Toxizität und die großen Dosen, welche deshalb appliziert werden mußten, machten es technisch unmöglich, die tödliche Grenze auch bei intravenöser Injektion festzulegen.

Am isolierten Froschherzen nach STRAUB zeigten *Manetol* und *Styptan* eine geringe Eigenwirkung erst in Konzentrationen von 1 : 20000 bis 1 : 10000. Man sah von diesen Konzentrationen an geringe Abnahme der Hubhöhe. Der Adrenalin- und Azetylcholineffekt wird unter dem Einfluß der Präparate nicht verändert. Herzstillstand konnten wir erst bei einer Konzentration von 1 : 20 erzielen.

In *Blutdruckversuchen* an Kaninchen (TRENDELENBURGsche Gegenstrominfusion, Quecksilbermanometer, Urethannarkose 1,5 g/kg) sahen wir bei Injektion in die V. jugularis flüchtige Blutdrucksteigerungen — etwa mit der Dauer nach einer Adrenalingabe vergleichbar — um 20—25 mm Hg. In 4 Versuchen war bei Gaben von 0,1—0,25 g/kg *Manetol* oder *Styptan* dieses Verhalten reproduzierbar. Die Adrenalinwirkung war bei gleichzeitiger Gabe unterschwelliger Dosen bzw. kurz nach der Injektion der Präparate nicht verändert.

Um die Gefäßwirkungen der Präparate genauer zu erfassen, wurden Versuche am *isolierten Arterienstreifen* der A. femoralis, mesenterica bzw. renalis vom Typus bovinus angestellt. Die methodischen Grundlagen der Versuchsanordnung sind in den Arbeiten von ROTHLIN[21] niedergelegt. Die neuesten Untersuchungen über die Physiologie isolierter Arterienstücke brachten keine Ergebnisse, die in Anbetracht der hier vorliegenden Fragestellung interessieren[22]. Wir folgten daher den technischen Angaben von ROTHLIN genau. *Manetol* und *Styptan* hatten dabei in Konzentrationen bis 1 : 1000 keine Eigenwirkung auf die Gefäßstreifen. In den Verdünnungen bis 1 : 10000 sahen wir keine Veränderungen der Adrenalinwirkung.

Im LAEWEN-TRENDELENBURG*schen Versuch* wurde an durchströmten hinteren Extremitäten des Frosches nach Einstellung auf Adrenalin an

gut empfindlichen Präparaten die Gefäßwirksamkeit geprüft. Die Konzentration 10^{-6} beeinflußte bei einer Dauerdurchströmung (60 min lang) die Durchflußgeschwindigkeit nicht, doch führte eine nach der Durchströmung gegebene Adrenalingabe, die vorher fast ohne Eigenwirkung war, nun zu einer starken Gefäßkontraktion so, daß es meist zur Blokkierung des Durchflusses kam. Auch mehrere Stunden hinterher nach Durchspülung mit Ringerlösung war die Adrenalinsensibilisierung sehr stark und unverändert. Nie beobachteten wir ein Präparat welches zu seiner ursprünglichen Empfindlichkeit zurückkehrte. Die mögliche Steigerung der Adrenalinempfindlichkeit der Präparate durch „Alterung" konnte in unseren Versuchen ausgeschlossen werden. In Leerversuchen bei Durchströmungen von gleicher Dauer mit Ringerlösung sahen wir in dem uns interessierenden Zeitabschnitt niemals eine Veränderung der Adrenalinwirkung, die das Maß der üblichen Schwankungsbreite überschritt.

Ein Protokollauszug eines Versuches soll die hier zusammengefaßten Ergebnisse im einzelnen erläutern.

Versuch vom 20. 5. 1949. Rana esculenta.

Zeit	Zeit in Sekunden für 10 gtt.
9:30	8,2
9:45	8,0
9:55	7,6
9:56	7,8 8,6
	0,1 cm³ Adrenalin 10^{-6}
9:58	11,8; 12,1; 12,8; 13,0; 13,5; 14,0; 12,1; 11,0
10:10	8,1 8,0
10:12	8,2 9,3 10,8
	0,15 cm³ Adrenalin 10^{-6}
10:16	26,1 29,6 30,1 28,3
10:24	8,0
10:27	8,0 7,8 8,2
	0,1 cm³ Adrenalin 10^{-6}
	10,0 11,7 13,0
10:30	umgeschaltet auf Manetol 10^{-6}
10:40	8,0
11:02	7,6
11:30	7,8
	umgeschaltet auf Froschringer
11:40	0,1 cm³ Adrenalin 10^{-6}
11:44	23,0 31,6 40,2 55,3 Blockierung des Durchflusses
12:45	7,4 8,1
13:40	9,8 12,1 16,5 20,8
	0,1 cm³ Adrenalin 10^{-6}
	28,0 34,3 39,1 45,3 50,8 54,3
	Blockierung des Durchflusses.

Unsere Adrenalinlösungen stellten wir uns aus Suprarenin „Bayer" her. Es wurden stets frische Lösungen verwendet. Die Durchflußgeschwindigkeit wurde mit der Stoppuhr gemessen. Das Adrenalin wurde mit einer Präzisionsspritze in den Schlauch injiziert.

Bei Injektionsversuchen mit *Manetol* und *Styptan* konnte dieser Befund nicht erhoben werden. Der Adrenalineffekt ist also von einer gewissen Zeitdauer der Einwirkung abhängig. Über diesen Umstand ist schon in der klinischen Kasuistik über die Wirkung der Präparate berichtet worden.

Die Steigerung der Adrenalinempfindlichkeit des Froschdurchströmungspräparates konnte auch beobachtet werden, wenn man, der therapeutischen Anwendung der Präparate folgend, den Fröschen 10 bis 24 Std vor Versuchsbeginn 0,01—0,1 g/kg in den Bauchlymphsack spritzte. Die Versuche wurden so angesetzt, daß Frösche gleichen Geschlechts und gleicher Herkunft, die unter gleichen äußeren Bedingungen gehalten worden waren, zum Teil mit *Manetol* bzw. *Styptan* in der oben angeführten Weise behandelt wurden. Eine andere Serie erhielt Leerinjektionen mit 0,6%iger Kochsalzlösung und diente als Vergleichspräparat für die Adrenalinwirkung. Es zeigte sich, daß eine 1malige Adrenalingabe (0,05—0,2 cm^3 der Lösung 10^{-6}) genügte, um bei den mit Hämostatika vorbehandelten Tieren eine Dauerkontraktion hervorzurufen, die oft so lange anhielt, daß das Präparat für weitere Versuche überhaupt nicht mehr zu gebrauchen war. Die Gefäßkontraktion nach gleich großen Adrenalingaben bei den nicht vorbehandelten Präparaten klang in der üblichen Zeit von 3—6 min nach der Injektion ab, und war beliebig oft reproduzierbar*.

Am *isolierten Kaninchenohr nach* KRAWKOFF-PISSEMSKI waren die Ergebnisse analog, besonders auch bezüglich der wirksamen Grenzkonzentration von *Manetol* und *Styptan*. Manchmal war die Adrenalinsensibilisierung hier auch noch in Verdünnungen von 10^{-7} in ähnlichem Umfang erreichbar.

Zur weiteren Analyse des Angriffspunktes injizierten wir Fröschen (R. esculenta) in Urethannarkose 0,1—1,0 g/kg der Organextrakte und beobachteten die Wirkungen auf die *Gefäße der Schwimmhäute* mikroskopisch in vivo. Man konnte hier nach einiger Zeit enger gestellte Kapillaren mit verlangsamter Blutströmung beobachten. Bei allen Vorbehalten die man bei der Ausdeutung solcher subjektiven Versuche machen muß, und unter Berücksichtigung des Umstandes, daß bei unzarter Manipulation (Überdehnung) sich die Blutgeschwindigkeit spontan verlangsamen kann, glauben wir doch diese Beobachtungen mit in den Kreis unserer Befunde einbeziehen zu können. Die Versuchsanordnung ließ im übrigen den Beobachter nicht erkennen, welches Tier mit den Präparaten behandelt worden war.

* Um auszuschließen, daß diese Effekte auf beigefügten Konservierungsmitteln beruhen, verwandten wir Styptan-Chargen die ohne konservierende Zusätze hergestellt wurden.

Um festzustellen, ob die untersuchten Stoffe auch noch an anderen Organen wesentliche Eigenwirkungen haben, untersuchten wir am *isolierten überlebenden Meerschweinchendarm* mit der MAGNUS-Methode. Erst in Konzentrationen von 1 : 15000 und darüber sahen wir vermehrte Peristaltik bzw. Tonusanstieg. Ein Verhalten, welches der Adrenalinwirkung durchaus entgegengesetzt und nur mit Azetylcholineffekten vergleichbar ist.

Besprechung der Ergebnisse.

Die dargestellten Untersuchungen ergeben, daß Organextrakte aus dem Rückenmark, wie sie in den Präparaten *Manetol* und *Styptan* vorliegen, eine spezifische und gerichtete Wirkung haben, die ihre Anwendung als Hämostyptika experimentell begründet erscheinen läßt. Am Wirkungsort, der in den Arteriolen bzw. Kapillaren zu suchen ist, erreicht man mit Konzentrationen ohne Eigenwirkungen die durchaus im therapeutischen Bereich liegen (10^{-6}—10^{-7}) Sensibilisierungen für unterschwellige Adrenalindosen.

Die Spezifität der Inhaltsstoffe der Hämostatika wird durch Beobachtungen von KEYMER[24] unterstrichen, der den Einfluß von Pepton und Adhaegon „Heyden" auf die Adrenalinwirkung am LAEWEN-TRENDELENBURGschen Präparat untersuchte und durch diese Stoffe keine Sensibilisierungen gesehen hat.

Es besteht nach den hier beschriebenen Befunden kein Grund, bei der therapeutischen Verwendung von Hämostatika einen anderen Wirkungsmechanismus anzunehmen. Auch macht es keine Schwierigkeiten sich vorzustellen, daß bei einer Operation im Sinne einer Notfallfunktion vermehrt ausgeschütteten Adrenalinmengen genügen, um bei einem mit *Manetol* oder *Styptan* vorbehandelten Patienten eine Gefäßkontraktion in ausreichendem Umfang herbeizuführen. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß der Sensibilisierungseffekt auf die Arteriolen und Kapillaren beschränkt ist. Es ergibt sich daher: 1. die Brauchbarkeit der Präparate bei parenchymatösen Blutungen — darüber liegen schon zahlreiche klinische Berichte vor — und 2. eine weitere Erklärung für die in der Literatur oft angegebene schlechte Wirksamkeit der Präparate. Eine Tatsache, die durchaus mit den Ergebnissen der eingangs geschilderten Mäuseversuche übereinstimmt. Denn diese Untersuchung wurde an Gefäßgebieten (Venen) vorgenommen, die durch geringe aktive Kontraktionsfähigkeit die dargestellten Sensibilisierungseffekte nicht deutlich zeigen können.

Über das in den untersuchten Präparaten vorhandene Substrat der pharmakologischen Wirkung liegen meines Wissens keine Untersuchungen vor. Nach den Angaben der Herstellerfirmen handelt es sich um Lipoproteide. In der Literatur[23] fanden wir die Angabe, daß eine Erklärung des Wirkungsmechanismus über einen besonders hohen Trombokinasegehalt der Präparate nicht zutreffend sei, da diese bei einer Untersuchung

nicht nachgewiesen werden konnte. Die geringe Toxizität und die relativ geringen Eigenwirkungen der untersuchten Organpräparate an anderen Substraten in Verbindung mit der gezielten Hauptwirkung scheinen der Vermutung über die Existenz spezifischer Extraktfraktionen doch eine gewisse Realität zu geben. Solange über das Substrat der Wirkung keine genaueren Untersuchungen vorliegen, scheint es verfrüht über die stofflichen Grundlagen theoretische Betrachtungen und Analogieschlüsse anzustellen. Auf die Schwierigkeiten solcher Deutungsversuche wurde von Gaddum[25] bei der Darstellung der Wirkung von Hirnextrakten ausdrücklich hingewiesen.

Zusammenfassung.

Zur Feststellung der mittleren Blutungszeit wurde durch Schnitte in die Schwanzvene von männlichen weißen Mäusen die Blutungszeit aus einer Wunde an einem größeren Tierkollektiv gemessen.

Eine posttraumatische Blutungsverkürzung wurde nicht beobachtet.

Bei Untersuchungen zur Wirkungsweise von Hämostatika (*Manetol* und *Styptan*) wurde festgestellt, daß diese Stoffe an den Arteriolen bzw. Kapillaren zur Adrenalinsensibilisierung führen.

Daraus können Rückschlüsse auf ähnliche Effekte bei der therapeutischen Anwendung gezogen werden.

Literatur.

[1] Duke, J.: J. amer. med. Assoc. **55**, 1185 (1910). — [2] Roskam, J.: Arch. internat. Physiol. **20**, 241 (1922). — [3] Roskam, J.: Thèse Liège. 1923. Zit. nach [10]. — Shirasaka: Fol. jap. pharmacol. **28**, 16 (1940). — [5] Schultz, W.: Klin. Wschr. **922**, 2002. — [6] Roskam, J.: C. r. Soc. Biol. Paris **112**, 1245 (1933). — [7] Derouaux, G.: C. r. Soc. Biol. Paris **116**, 633 (1934). — [8] Roskam, J., et L. Pauwen: C. r. Soc. Biol. Paris **123**, 276 (1936). — [9] Roskam, J.: Arch. internat. Pharmacodynamie **58**, 283 (1938). — [10] Fleisch, A., u. J. Tripod: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **200**, 118 (1942/43). — [11] Fleisch, A., u. J. Posternak: Helvet. physiol. Acta **1**, 199. (1943). — [12] Fleisch, A., u. J. Posternak: Helvet. physiol. Acta **3**, 11 (1945). — [13] Döttl, K., u. O. Ripke: Med. u. Chem. **3**, 267 (1936). — [14] Günther, H.: Die Variabilität der Organismen. Leipzig 1935. — [15] Stromberg, H.: Biochem. Z. **37**, 218 (1911). — [16] Dyckerhoff, H., u. R. Marx: Biochem. Z. **307**, 35 (1940). — [17] Dyckerhoff, H., u. R. Marx: Z. exper. Med. **110**, 390 (1942). — [18] Reinert, M., und A. Winterstein: Arch. internat. Pharmacodynamie **62**, 47 (1939). — [19] Derouaux, G.: Arch. internat. Pharmacodynamie **62**, 100 (1939). — [20] Baumann, Ed.: Chirurg **10**, 88 (1938). — [21] Rothlin: Biochem. Z. **111**, 219 (1920). — [22] Bürgi, S.: Helvet. physiol. Acta **1**, 3 (1943); **3**, 215 (1945). — Monnier, M.: Helvet. physiol. Acta **1**, 249 (1943); **2**, 279, 533(1944). — [23] Dyckerhoff, H., u. R. Marx: Z. exper. Med. **108**, 490 (1941). — [24] Keymer, G.: Diss. Pharmakol. Inst. Leipzig 1948. — [25] Gaddum-Dale: Gefäßerweiternde Stoffe der Gewebe, S. 100. Leipzig 1936.

Dr. F. Hohensee, Leipzig, Pharmakol. Institut.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 175—199 (1950).

Aus der Universitäts-Frauenklinik Rostock (Leiter: Prof. Dr. G. Haselhorst).

Das Problem der tödlichen Lungenembolie.

Von

Werner Hachmeister.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 27. Januar 1943.)*

Wenn über die Ätiologie und Therapie bei menschlichen Lungenembolien so außerordentlich zahlreiche und verschiedene Ansichten in der Literatur niedergelegt sind und immer wieder neue auftauchen, so darf man wohl daraus schließen, daß wir sowohl in der Ursachenforschung wie in unserem therapeutischen Handeln gegenüber der Lungenembolie noch vor vielen offenen Fragen stehen. Der häufig negative Erfolg unserer Maßnahmen bei fulminanter Lungenembolie bestätigt diese Schlußfolgerung.

Von welcher Seite die Embolieprobleme auch angegangen wurden, ob zunächst von der rein physiologischen oder ob von der Symptomatologie aus, eine befriedigende Auffassung von der Ätiologie und ebenso eine festfundierte Behandlungsart besitzen wir heute noch nicht. Rein physiologisch besteht bei der Lungenembolie nur insofern Klarheit, als 1. der Embolus in seiner stofflichen Zusammensetzung, 2. der Weg, 3. die Symptome wie Beklemmungsgefühl, Atemnot und einige andere mehr, bekannt sind. Unklar ist aber bereits, wie sich der Embolus unterwegs verhält, welche Kräfte ihn fördern und welche ihn hemmen.

Naegeli und Janker fanden in Tierexperimenten einen bewegungsfördernden Einfluß des Zwerchfells auf die Emboli; sie lähmten den N. phrenicus mit Novokain, jedoch gelang es nicht, dadurch die Förderung durch das Zwerchfell zu unterbinden.

Das Hauptproblem der tödlichen Lungenembolie ist die Frage nach der Todesursache. Bevor diese erörtert werden kann, müssen Einzelfragen beantwortet werden, deren Lösung zahlreiche experimentelle Untersuchungen erfordern.

Die tierexperimentellen Untersuchungen dieser Arbeit wurden zum großen Teil im Pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. Br. (Leiter: Prof. Dr. S. Janssen) angestellt.

1. Frage: Treten bei Änderungen der Embolimenge besondere Erscheinungen auf, die für den weiteren Verlauf der Lungenembolie wichtig sind?

2. Frage: Spielen etwaige Blutgifte bei den Erscheinungen der Lungenembolie eine Rolle?

3. Frage: Handelt es sich bei tödl. Lungenembolie um einen Reflextod?

4. Frage: Ist der Tod bei Lungenembolie ein Erstickungstod?

* Abdruck aus äußeren Gründen verzögert.

Treten bei Änderungen der Embolimenge besondere Erscheinungen auf, die für den weiteren Verlauf der Lungenembolie wichtig sind?

Um diese Frage experimentell zu beantworten, erschien von den zahlreichen früheren Methoden künstlicher Embolisetzung eigentlich nur die von MARTIN geeignet, d. h. eine Methode, bei welcher die Einzelemboli, bestehend aus Bariumsulfat und Eisenchlorid, genau der Menge nach berechnet werden konnten und auch röntgenologisch sichtbar waren. Wie sich jedoch bei Vorversuchen herausstellte, war auch die Methode nach MARTIN nicht befriedigend, da die Emboli starr waren und chemisch nicht indifferent genug erschienen.

Ich habe daher eine eigene Methode ausgearbeitet. Es wurden von mir Emboli verwandt, welche aus dem Eigenblut derjenigen Tiere hergestellt waren, die später zum Versuch der Lungenembolie benutzt wurden. Diese reinen Blutemboli entsprachen in ihrer Zusammensetzung und Konsistenz den natürlichen und wurden zur röntgenologischen Sichtbarmachung innen mit einem kleinen Kupferdrähtchen versehen. Mit diesen in ihrer Länge sowohl wie in ihrer Dicke festgelegten Blutemboli war es möglich, eine genaue Dosierung einzuhalten.

Ich habe nun bereits früher durch 10 Versuche an Hunden festgestellt, daß der Grad der Kreislauferscheinungen bei experimentell gesetzten Lungenembolien tatsächlich abhängig ist von der Anzahl der Einzelemboli, also damit von der Embolimenge.

Für Hunde im Gewicht von 11—13 kg zeigten Injektionen von 2—5 Emboli (Länge 2,3 cm, Dicke 4,5 mm) keinerlei akute Veränderungen im arteriellen und venösen Blutdruck. Für Hunde im Gewicht von 11—15 kg ergaben Injektionen von 15—20 Emboli sicher Kreislauferscheinungen, und zwar gleichzeitig arteriellen Blutdruckabfall wie Venendruckanstieg. Für Hunde im Gewicht von 10—15 kg zeigten Injektionen von 30 Emboli sicher einen akut tödlichen Ausgang.

Es ist selbstverständlich, daß bei solchen Kreislaufuntersuchungen nur Tiere gleicher Rasse und Tiere ziemlich gleichen Allgemeinzustandes miteinander verglichen werden können.

Da es infolge Mangels an geeigneten Hunden unmöglich erschien, unsere weiteren Versuche alle an derselben Tierart durchzuführen, wurde auch für *Katzen* die Menge der Emboli festgestellt, welche, in die Vena femoralis injiziert, 1. keinerlei Kreislauferscheinungen hervorrief, 2. nur zu vorübergehenden Störungen führte und schließlich diejenige Menge, die den Tod des Versuchstieres zur Folge hatte.

Auf Grund von 11 durchgeführten Katzenversuchen, die später noch ausführlicher gebracht werden, ergab sich, daß die *Menge der Emboli einen wesentlichen Einfluß auf den Verlauf der Lungenembolie hat* und daß es dadurch möglich ist, bei bestimmten einheitlichen Bedingungen von einer *tödlichen Embolimenge* zu sprechen.

Mit dieser Feststellung kann natütlich noch nicht die eigentliche Frage, warum der Tod eintrat, beantwortet werden, denn bei der Sektion der Tiere fand sich, daß der größte Teil der Gefäßbahn in den Lungenarterien noch durchgängig war. Wie wir in einem späteren Versuch genauer anführen werden, gelingt es tatsächlich unter bestimmten Be-

dingungen einem Tier die dreifache tödliche Dosis zu injizieren, ohne daß ein Exitus erfolgt.

Es erhob sich somit auch im Tierexperiment die Frage, warum die an sich noch zur Verfügung stehende Strombahn bzw. das zur Verfügung stehende Lungengewebe nicht zur Kompensation herangezogen wurde bzw. welche Kräfte diesen Ausgleich verhinderten. Klinisch wird diese Frage damit beantwortet, daß hier Reflexe zustande kommen, die eine Erholung unmöglich machen. Bevor wir tierexperimentell dieser Reflexauffassung nachgingen, suchten wir zunächst einmal nach Ursachen in der Lunge selbst.

Spielen etwaige Blutgifte bei den Erscheinungen der Lungenembolie eine Rolle?

Unter den Stoffen im Blute, die in erhöhten Konzentrationen die Gleichgewichtslage des Blutdrucks wesentlich nach der depressorischen Seite hin beeinflussen, kommen verschiedene in Frage. Es sind dies: Acetylcholin, Histamin, Adenosin und Kallikrein.

Das Acetylcholin ist in seiner depressorischen Wirkung auf die Gefäße so leicht durch Atropin auszuschalten, daß es leicht nachzuweisen wäre. In früheren Tierversuchen konnte ebenfalls die Blutdrucksenkung nach Lungenembolien durch Atropin nicht aufgehoben werden. Es kommt also Acetylcholin als blutdrucksenkende Substanz bei Lungenembolien nicht in Frage.

Adenosin ist in seiner Rolle als zirkulationsregulierender Stoff noch nicht geklärt und kommt im Lungengewebe nur in ganz minimalen Mengen vor.

Kallikrein, bisher noch nicht rein dargestellt, wurde von Frey u. a. im normalen Urin gefunden und soll, wie sein Name besagt, besonders im Pankreas vorkommen.

Es bleibt also von den depressorischen Stoffen lediglich das *Histamin*, welches auf Grund der bisherigen Erfahrungen über blutdrucksenkende Stoffe nicht ohne weiteres als Blutgift bei Lungenembolien ausgeschlossen werden konnte. Auffallend war ferner, daß die Symptome eines experimentellen Histaminschocks den Erscheinungen bei Lungenembolien so sehr ähneln, daß die Vermutung nicht von der Hand zu weisen war, es könne ähnlich wie beim Verbrennungsschock Histamin im Gewebe freigesetzt werden. Auch ist bekannt, daß vorübergehende Kreislaufunterbrechung einer Hundeextremität das Freiwerden eines Stoffes verursacht, der pharmakologisch als Histamin identifiziert werden konnte. Man könnte sich also vorstellen, daß die durch den Embolus bedingte Kreislaufunterbrechung der ausgeschalteten Lungenteile eine Histaminausschüttung zur Folge hätte, zumal das Lungengewebe im Vergleich zu anderen Organen gerade an Histamin einen sehr großen Gehalt besitzt — 30—70 mg pro kg Lunge — und auch produzieren kann.

Histaminuntersuchungen.

Die Versuche wurden an *Hunden* ausgeführt. Dabei wurde der arterielle Blutdruck von der Arteria femoralis, der Venendruck von der V. jugularis aus blutig mit einem Quecksilber- bzw. Wassermanometer und P. TRENDELENBURGscher Gegenstromapparatur gemessen. Die Arteria carotis diente zur Blutentnahme. Zur Histaminbestimmung wurde die Methode nach CODE gewählt, mit der Abänderung, daß der Trockenrückstand nicht in einfach destilliertem, sondern in doppelt destilliertem Wasser aufgenommen wurde. Es stellt dies eine wesentliche Erleichterung bei der späteren Neutralisierung auf pH 6,9—7,1 dar. Der Extrakt wurde am Meerschweinchendarm ausgewertet. Die Methode nach CODE ergab nach einer vorherigen Prüfung mit Standardlösungen am Blutdruck der Katze und am Meerschweinchendarm eine Genauigkeit von 75—80%.

Von den zur Verfügung stehenden 5 Hunden wurde einer durch Ätherinhalation narkotisiert, 2 andere durch intravenöse Chloraloseinjektionen (0,07 g pro kg) und 2 weitere durch Lokalanästhesie der Carotisgegend. Der normale Histamingehalt in 1 cm^3 Blut schwankte zwischen 0,02 und 0,04 γ. Durch die angewandten Narkosearten traten keine nennenswerten Verschiebungen im Histamingehalt des Blutes auf. (Auf eine Ausnahme kommen wir später noch zu sprechen.)

Nach Injektion der Blutemboli wurde zunächst 30 sec gewartet und sodann die 1. Blutprobe abgenommen. Zur Untersuchung kam dann der 6.—15. cm^3 Blut, da die ersten 5 cm^3 nach der Entnahme dem Tier wieder eingespritzt wurden, um einen unnötigen Blutverlust zu vermeiden. Auf diese Weise erhielten wir immer frisches Lungenblut.

Die weiteren Blutproben wurden dann nach 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 und 65 min entnommen; folgende Werte wurden errechnet:

Histamingehalt in Gamma:

1. Nach 30—60 sec:	0,03,	0,12,	0,03,	0,03,	0,3.	
2. Nach 2—5 min:	0,03,	0,25,	0,03,	0,04.		
3. Nach 7—8 min:	0,02,	0,07.				
4. Nach 10 min:	0,085,	0,03,	0,03,	0,04.		
5. Nach 15 min:	0,08,	0,09,	0,025,	0,03,	0,03.	
6. Nach 20—25 min:	0,02,	0,03,	0,08,	0,04,	0,02.	
7. Nach 30—35 min:	0,09,	0,025,	0,03,	0,025.		
8. Nach 40—65 min:	0,16,	0,03,	0,02,	0,15,	0,21,	0,02.

Zu erwähnen ist noch ein weiterer Versuch. Die hohen Histaminwerte in der Tabelle stammen zum größten Teil von einem Hund, welcher reinen Äther als Narkoticum erhielt. Da der Verdacht nahe lag, daß eventuell der Äther als Reizstoff auf die Lunge gewirkt habe und es so vielleicht zu einer vermehrten Histaminabgabe in der Lunge kam, wurde bei einem 6. Hund der Versuch mit reiner Äthernarkose wiederholt.

Es wurden Blutproben vor der Narkose, während der Narkose und nach der Lungenembolie entnommen. Der Histamingehalt stieg jedoch nie über 0,04 γ pro cm^3 hinaus. Dieser Kontrollversuch erschien uns nötig, da GARAN nämlich zeigen konnte, daß die Histaminabgabe in der Lunge sich nach Reizstoffatmung — wie bei Ammoniak und Benzolinhalation — nach 2—5 min erhöhte. Da der Kontrollversuch keine erhöhten Werte ergab, müssen die erhöhten Histaminwerte des mit reinem Äther narkotisierten Hundes wohl auf eine besondere Reaktionslage der Lunge beruhen, wie sie von anderen Autoren schon des öfteren beobachtet wurde, sie entspricht nicht der Regel.

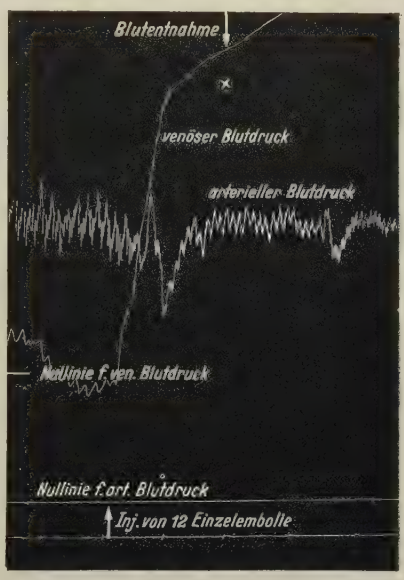


Abb. 1. Hund, 26. 3. 38. Künstliche Lungenemboliesetzung. Nach Injektion von 12 Einzelemboli sinkt der arterielle Blutdruck ab, während gleichzeitig der venöse Blutdruck ansteigt. 1 min nach der Embolie (in der Abbildung mit + bezeichnet) beträgt der Histamingehalt im Karotisblut 0,03 γ.

Es ergibt sich somit auf Grund der an 6 Hunden durchgeführten Histaminuntersuchungen folgende Feststellung:

Nach künstlich gesetzten, zum Teil tödlich verlaufenden Lungenembolien an 6 Hunden wurden innerhalb der ersten 65 min nach Beginn der Lungenembolie im arteriellen Blut eine nur geringe oder gar keine Vermehrung des Histamingehaltes gefunden. Die Erscheinungen nach Lungenembolien, wie Lungenstarre, Absinken des arteriellen und Ansteigen des venösen Blutdrucks können also nicht als Folgen einer vermehrten Histaminausschüttung in der Lunge angesehen werden. Diese Feststellung erfährt insofern eine Einschränkung, als sie nur für die heutigen Methoden des Histaminnachweises gilt. Eine chemische Isolierung des Histamins aus dem Blute ist bisher mengenmäßig noch nicht möglich.

Kann man bei tödlichen Lungenembolien von einem Reflextod sprechen?

Sind die immer wieder vertretenen Anschauungen, daß der Tod durch Lungenembolie eine Reflexwirkung sei, richtig, so muß es gelingen, durch Ausschaltung der Reflexe den Tod des Tieres solange hintanzuhalten, bis die Embolimenge injiziert worden ist, die zwei Drittel oder mehr der Lungenstrombahn mechanisch ausschaltet. Die Embolimenge, welche bei erhaltenen Reflexen tödlich wirkte, müßte dann bei ausgeschalteten Reflexen auf den Blutdruck des Tieres fast wirkungslos sein.

Es ist des öfteren versucht worden, diesen reflexlosen Zustand für die Lungenembolie im Tierexperiment zu erreichen (KRÖTZ, RADNAI und

MOSONYI, WALDER u. a.). Auf Grund unserer physiologisch-anatomischen Kenntnisse ist klar, daß man den Vagus in der Hauptsache beschuldigen muß, wenn reflektorisch bedingte Störungen im Koronarkreislauf auftreten (ANREP, SEGALL, REIN, DIETRICH und SCHWIEGK).

Nach den bisherigen physiologischen Anschauungen kann eine Reflexwirkung im Lungengebiet des Vagus nicht mehr zustande kommen, wenn man bei einem Tier durch Vagotomie und Dekapitation den Reflexbogen des Vagus sowie sein Zentrum ausschaltet. Die tödliche Embolimenge muß sich danach beträchtlich erhöhen.

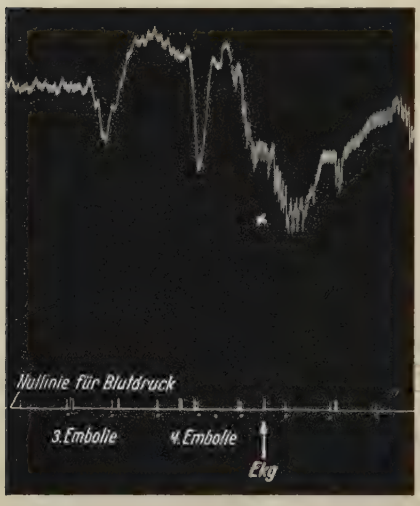


Abb. 2. Katze, 14. 1. 39. Wirkung der 3. und 4. Embolieserzung auf den arteriellen Blutdruck. Vor und nach Injektion der Emboli wurden Elektrokardiogramme aufgenommen. Nach der 4. Embolie trat bei + ein 2 : 1 Schenkelblock auf.

An Hand unserer früheren Feststellungen, daß die Embolimenge einen wesentlichen Einfluß auf die Kreislauferscheinungen bei Lungenembolien hat, haben wir untersucht, ob eine bestimmte Embolimenge geringeren Einfluß auf den Blutdruck hat, wenn die Reflexwirkung, die ja vom Embolus ausgehen soll, ausgeschaltet wird.

Zur Klärung dieser Frage haben wir die Kreislaufwirkung einer bestimmten Embolimenge 1. bei Katzen in Chloralosenarkose, 2. bei Katzen in Chloralosenarkose mit Vagotomie und 3. schließlich noch das Verhalten des Blutdrucks bei dekapitierten Katzen geprüft.

Die Wirkung nach Injektion einer bestimmten Embolimenge bei narkotisierten und nichtnarkotisierten Tieren wurde früher bereits in Hundeversuchen festgestellt. Wesentliche Unterschiede im Verhalten des Blutdrucks und im weiteren Verlauf der Embolie ergaben sich nicht.

Versuche.

Von den Versuchen seien einige als Beispiele angeführt.

1. *Katze:* 16. 12. 38. Gewicht 4300 g, Narkose: Chloralose 0,07 g/kg. Messung des arteriellen Blutdrucks an der li. Art. femoralis.

Nach Injektion von 35 Einzelemboli (Länge 1 cm, Dicke 3 mm, aus Blut hergestellt) erfolgt nach 10 sec ein stetiger Blutdruckabfall, der nach 3 min zum Exitus des Tieres führte.

4. *Katze:* 14. 1. 39. Gewicht 4000 g, Narkose: Chloralose.

1. Embolie: Injektion von 12 Einzelemboli. Erfolg: Blutdruck sinkt von 130 auf 100 mm Hg. Erholungszeit 30 sec. Nach 6,5 min Pause

2. Embolie: Injektion von 5 Einzelemboli. Erfolg: Blutdruck sinkt nicht. Nach 6 min Pause erfolgt

3. Embolie: Injektion von 6 Einzelemboli. Erfolg: Der Blutdruck sinkt um 20 mm Hg. Erholungszeit 45 sec. Nach 5 min Pause die

4. Embolie: Injektion von 5 Einzelemboli. Erfolg: Der Blutdruck sinkt um 50 mm Hg. Erholungszeit 5 min.

6. *Katze:* 25. 1. 39. Gewicht 3300 g, Narkose: Chloralose, doppelseitige Vagotomie mit Trachealkanüle.

Nach Injektion von 12 Einzelemboli sinkt der Blutdruck um 30 mm Hg (160 : 130). Das Tier erholt sich nach 90 sec wieder. Der Blutdruck sinkt nicht weiter ab, sondern bleibt auf 130 mm Hg stehen. Nach 10 min Pause erfolgt der

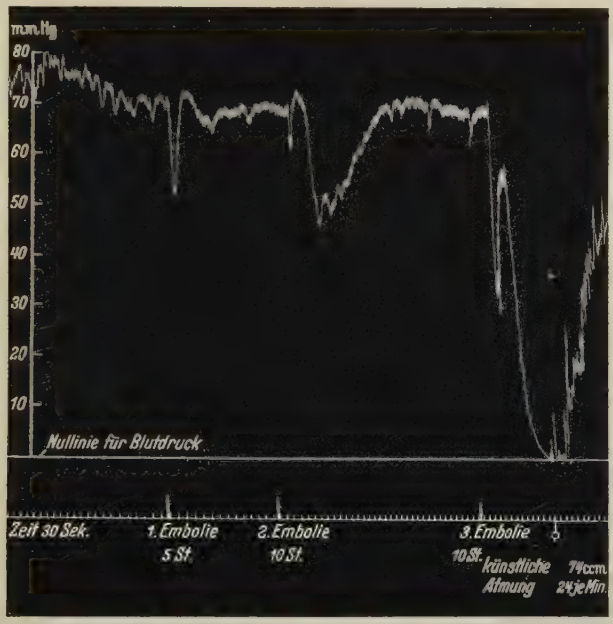


Abb. 3. Katze, 1. 2. 39. Wirkung von 3 Emboliesetzungen auf den Blutdruck der Katze. Nach jeder Emboliesetzung fällt der arterielle Blutdruck ab, nach der 3. Embolie totaler Abfall auf 0 mm Hg. Durch künstliche Atmung (24mal 74 cm³ pro min) gelingt es, den Blutdruck wieder zu erhöhen.

2. Embolischub: Injektion von 18 Einzelemboli. Erfolg: der Blutdruck sinkt auf 70 mm Hg und steigt nur auf 100 mm wieder an. 4 Std später Exitus an Lungenödem.

8. *Katze:* 1. 2. 39. Gewicht 2450 g, Narkose: Chloralose.

1. Embolie: Mit 5 Einzelemboli. Erfolg: Blutdruck sinkt von 140 auf 105 mm Hg (um 35). E. Z. (Erholungszeit) = 45 sec. Nach einer Pause von 7 min erfolgt die

2. Embolie: Mit 10 Einzelemboli. Erfolg: Blutdruckabfall von 140 auf 90 mm Hg (um 50). E. Z. 12 min. Nach Pause von 17 min

3. Embolie: Mit 10 Einzelemboli. Erfolg: Der Blutdruck sinkt von 140 auf 0 mm Hg ab. Künstliche Atmung läßt den Blutdruck nach einigen Minuten auf 100 mm Hg ansteigen. Die Katze blieb später auch ohne Pulmotor auf ihrer

normalen Blutdruckhöhe stehen. Der ohne künstliche Atmung sicher eingetretene Tod der Katze wäre also nicht als eigentlicher Herztod anzusehen.

9. *Katze:* 8. 2. 39. Gewicht 3440 g, dekapitiert und doppelseitig vagotomiert.

1. Embolie: Mit 10 Einzelemboli. Erfolg: Der Blutdruck sinkt um 10 mm Hg (von 70 auf 60). Der vor der Dekapitation gemessene Blutdruck betrug 160 mm Hg. Infolge der Dekapitation mit Zerstörung des Vasomotorenzentrums sank der Blutdruck dann auf 70 mm Hg ab. Nach 1 min hatte der Blutdruck seinen Ausgangswert (70 mm Hg) überschritten, steht nach 8 min jedoch wieder auf 70 mm Hg. Nach 10 min Pause erfolgt die

2. Embolie: Mit 10 Einzelemboli. Erfolg: Blutdruckabfall um 14 mm Hg (von 70 auf 56 mm Hg). Nach 1,5 min überschreitet der Blutdruck seinen Ausgangswert, steht aber nach 4 min wieder auf 70 mm Hg. Nach einer 2. Pause erfolgt die

3. Embolie: Mit 15 Einzelemboli. Erfolg: Der Blutdruck sinkt bis auf 0 mm Hg ab. Exitus.

14. *Katze, 10. 3. 39. Gewicht 3750 g. Narkose: Chloralose.*

Embolie Nr.	Anzahl der Einzelemboli in Stück	Erfolg-Blutdrucksenkung in mm Hg	E. Z. (Erholung)	Pause in min
1	5	180:110 (70)	3 min	15
2	15	165:150 (15)	30 sec	5
3	10	160:150 (10)	30 sec	75
4	15	110: 90 (20)	30 sec	5
5	15	110: 65 (45)	2 min	12
6	15	100: 85 (15)	30 sec	20
7	15	100: 70 (30)	2 min	7

Das Tier wurde später getötet.

Vergleichen wir nun nach Anführung unserer Versuche an vagotomierten und nichtvagotomierten Katzen die Wirkung auf den Kreislauf und die Erholungszeit nach den 1. und 2. Embolischüben (siehe Tab. 1), so ergibt sich daraus folgendes:

Wenn man vagotomierten und nichtvagotomierten Katzen eine ungefähr gleiche Anzahl von Einzelemboli injiziert, so ist die Blutdrucksenkung bei beiden etwa die gleiche. Dies gilt sowohl für die 1. wie für die 2. Embolischübe (siehe Tab. 1). Vagotomierte Katzen sind also gegen Lungenembolie nicht unempfindlicher als nichtvagotomierte. Vergleichen wir die *Erholungszeiten* nach Lungenembolien an vagotomierten und nichtvagotomierten Katzen, so ergibt sich, daß die vagotomierten Katzen im Durchschnitt eine 3mal längere Erholungszeit benötigen als die nichtvagotomierten. Die Behauptung einiger Autoren, die wesentliche Schädigung bei Lungenembolien sei darin zu sehen, daß reflektorisch eine starke Vagusreizung zustande käme, können durch diese Versuche nicht bestätigt werden.

Auch bei Ausschaltung der zentralen Vaguskerne, wie sie durch die Dekapitation erreicht wird, wurden, wie dies der Katzenversuch Nr. 9 zeigt, die Kreislauferscheinungen nach Lungenembolien nicht geringer. Daß hierbei die Blutdrucksenkungen an sich geringer sind als bei nicht

vagotomierten, hat nichts zu besagen, da hierbei ja von vornherein infolge Zerstörung des Hauptvasomotorenzentrums ein niedrigerer Blutdruck besteht, bedingt durch die Tonuslosigkeit der Gefäße.

Tabelle 1.

Embolie Nr.	Nr. der Katze	Anzahl der Einzelemboli	Blutdruckabfall in mm Hg	Erholungszeit
E. 1	2	10	40	10 sec
E. 1	10 vagotomiert	10	30	5 sec
E. 1	3	8	10	10 sec
E. 1	12 vagotomiert	10	7	60 sec
E. 1	4*	12	30	30 sec
E. 1	6*vagotomiert	12	30	90 sec
E. 1	13	15	30	30 sec
E. 1	7 vagotomiert	15	40	4,5 min
E. 2	2	15	40	60 sec
E. 2	10 vagotomiert	10	30	5 sec
E. 2	3	22	70	7 min
E. 2	6*vagotomiert	18	60	18 min
E. 2	4*	5	0	0 min
E. 2	12 vagotomiert	10	10	60 sec
E. 2	13	10	30	20 sec
E. 2	7 vagotomiert	15	50	10 min

Anmerkung: Die mit * versehenen Katzen sind im einzelnen angeführt.

Beobachten wir nun den *weiteren Verlauf* an vagotomierten und nichtvagotomierten Tieren nach künstlich gesetzten Lungenembolien, so kommen wir zu folgendem Bild.

Injektionen von 25—30 Einzelemboli in 2—3 Schüben zeigen — wie die Versuche ergeben — einen anderen Verlauf bei den vagotomierten als bei den nichtvagotomierten. 3 nichtvagotomierte Katzen (Nr. 3, 4 und 8) überstehen die Injektionen und bleiben am Leben, von ihnen hat nur eine — Nr. 8 — nach 30 min den normalen Blutdruck noch nicht wieder erreicht. Auch die vagotomierten Katzen überleben den akuten Embolieanfall nach Injektion bis zu 30 Einzelemboli in 2—3 Schüben, von ihnen bleibt jedoch nur eine (Nr. 7) am Leben, während die anderen (Nr. 6, 10 und 12) später innerhalb von einigen Stunden zugrunde gehen. Katze Nr. 6 bleibt nach dem letzten Embolischub um 30 mm Hg unter ihrem normalen Blutdruckwert stehen und stirbt 4 Std nach der Embolie. Katze Nr. 7 bleibt zwar am Leben, ihr Blutdruck ist aber nach 30 min noch nicht wieder normal. Katze Nr. 10 ist ebenfalls nach 30 min in ihrem Blutdruck nicht ganz zur Norm zurückgekehrt und stirbt 9 Std nach der Embolie. Katze Nr. 12 stirbt 2 Std nach der Embolie, obwohl sich der Blutdruck nach dem 3. Embolischub nur um 10 mm Hg gesenkt hatte.

Wir kommen also zu dem Schluß, daß der *weitere Verlauf* nach künstlich gesetzten Lungenembolien bei nichtvagotomierten Katzen *günstiger* ist als bei vagotomierten Tieren. Dabei sind wir uns der komplizierten

Verhältnisse, die durch doppelseitige Vagotomie hervorgerufen werden, durchaus bewußt. Pharmakologische Versuche, den Vagus mit Atropin in seiner Erregbarkeit nur zu hemmen, haben jedoch bei tierexperimentellen Lungenembolien genau so wenig Erfolg gehabt (KROETZ), wie die von uns ausgeführten Vagotomien.

In meinen eigenen Versuchen wurde 1. der Vagus durchschnitten und 2. die Vaguskerne durch Dekapitation zerstört und sodann der Einfluß auf die verträgliche Embolimenge gegenüber nicht vagotomierten Tieren bei Lungenembolien geprüft. Das Ergebnis ist: Die Vagotomie erhöht die verträgliche bzw. tödliche Embolimenge nicht, die Ausschaltung einer Vagusreizung schafft also keine günstigeren Verhältnisse bei tierexperimentellen Lungenembolien.

Die Vertreter der Reflextheorie haben nun zum Beweis ihrer Ansicht typische Veränderungen in der Herzmuskulatur angeführt. Sie gingen davon aus, daß, wenn bei Lungenembolien eine über den Vagus gehende reflektorische Verengerung der Koronargefäße stattfindet, sich dann auch

1. im Elektrokardiogramm Veränderungen finden müßten, die einer Minderdurchblutung des Herzmuskels entsprechen.

2. histologisch infolge eines Sauerstoffdefizits des Koronarblutes im Herzmuskel Nekrosen zeigen müßten. Danach käme der Tod bei Lungenembolien einem Herzmuskelerstickungstod gleich.

Ist der Tod bei Lungenembolien ein Erstickungstod?

Es erhebt sich somit als erstes die Frage, ob die bei Lungenembolien auftretenden Veränderungen in der Herzstromkurve *für* eine Minderdurchblutung des Herzmuskels infolge eines Koronarkrampfes sprechen oder nicht. Die bisher angestellten Versuche über den Verlauf des Ekgs. bei Lungenembolien sind mit den bereits oben erwähnten unphysiologischen Methoden ausgeführt und zeigen so verschiedene Ergebnisse, daß es berechtigt erschien, die *Veränderungen der Herzstromkurven bei tierexperimentellen Lungenembolien mit unserer Methode nachzuprüfen.*

11 Katzen wurden zur Herzstromregistrierung benutzt. Während der Versuchszeit wurde für die nötige Erwärmung des Tieres gesorgt, um einen Kälteschock und damit Ekg.-Veränderungen zu vermeiden, die vielleicht eine Koronarinsuffizienz vortäuschen könnten. Von den Versuchsprotokollen sei hier ein Beispiel angeführt.

8. *Katze:* 8. 2. 39. Gewicht 3440 g. Dekapitation und Vagotomie.

Die Embolien wurden 75 min nach der doppelseitigen Vagotomie und 45 min nach der Dekapitation gesetzt. Ekgs wurden aufgenommen vor der Embolie, während der Injektion der Emboli, während des Blutdruckabfalls und während des Wiederanstiegs und nach Erholung des Tieres. Bei der 1. und 2. Embolie wurden je 10 Einzelemboli injiziert, die beidemal eine Blutdrucksenkung von 10 bzw. 14 mm leg zur Folge hatten. Außer Änderungen der Pulsfrequenz fand sich in allen 3 Ab-Hitungen nur eine vorübergehende Aufsplitterung von P und Auftreten von

U-Wellen in der Finalschwankung. Dagegen trat nach der 3. Embolie, die innerhalb von wenigen Minuten den Exitus zur Folge hatte, in der 1. Ableitung ein hoher Abgang von S mit bogenförmigem Verlauf nach unten und negativen *T*-Zacken auf. Der QRS-Komplex war aufgesplittert und verknotet.

Zusammenfassung der Ekg.-Befunde.

Als Ergebnis der Ekg.-Untersuchungen nach tierexperimentellen Lungenembolien läßt sich folgendes feststellen:

Das Verhalten der Herzstromkurve nach künstlichen Lungenembolien ist verschieden. Bei 9 Embolisetzungen, die gleichzeitig mit Blutdruckabfall einhergingen, traten selbst während des Blutdruckabfalls keinerlei

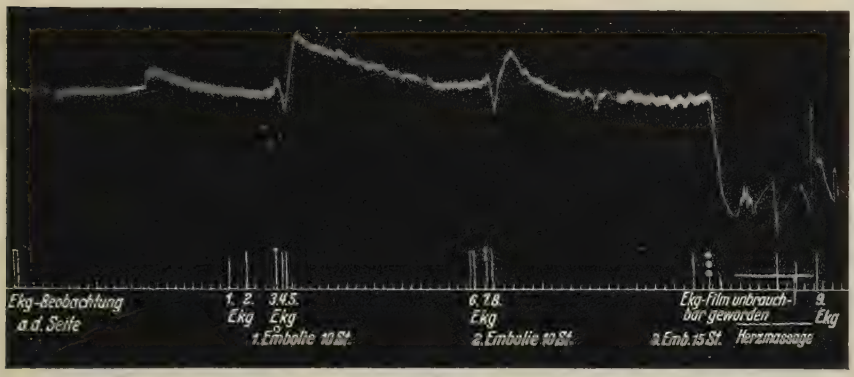


Abb. 4. Katze, 8. 2. 39. Die Abbildung zeigt 3 künstliche Embolisetzungen an einer vagotomierten und dekapierten Katze. Bei der 1. und 2. Embolie steigt der Blutdruck durch Überkompensation nach der Senkung über seinen Ausgansgwert an. Nach der 3. Lungenembolie kommt es zum Exitus trotz Herzmassage. Wesentliche Ekg.-Veränderungen treten erst nach der 3. Embolie, also beim Absterben der Katze auf.
(In der Abb. 4 links muß es statt Seite Saite heißen.)

Veränderungen im Ekg. auf. Bei diesen Tieren waren die Vagi bis auf eine Katze intakt gelassen. Nach 8 anderen Embolisetzungen, die mit Blutdruckabfall einhergingen, traten Senkungen des Zwischenstückes oder negative *T*-Zacken auf. Von diesen 8 Embolisetzungen wurden 4 an vagotomierten und 4 an nichtvagotomierten Tieren ausgeführt. Die eine vagotomierte Katze war gleichzeitig dekapitiert. In 3 Fällen traten nur geringe Aufsplitterungen auf und in 6 Fällen von Embolisetzungen zeigten sich während des Blutdruckabfalls Kurven vom Typ des rechten Schenkelblocks. Bei diesen Schenkelblockkurven handelte es sich 3 mal um Kurven von absterbenden Herzen. Die Tiere kamen einige Minuten später ad exitum. In 3 Fällen war der Schenkelblock nur vorübergehender Natur. Ein Schenkelblock *ohne* gleichzeitigen Blutdruckabfall trat *nicht* auf. Nur eine Embolisetzung hatte keinen Blutdruckabfall zur Folge, sie zeigte auch keine Ekg.-Veränderungen.

Tabelle 2. *Bei 27 Embolisetzungen wurde das Ekg. registriert.*

	Ekg.-Veränderungen
9 Embolien mit Blutdruckabfall	Keine
8 Embolien mit Blutdruckabfall	Senkung des Zwischenstücks und negative T-Zacke
3 Embolien mit Blutdruckabfall	Nur Aufsplitterungen
6 Embolien mit Blutdruckabfall	Rechter Schenkelblock, davon 3 ante exitum, 3 vorübergehend
1 Embolie ohne Blutdruckabfall	Keine

Stellen wir nun noch einmal die oben erwähnte Frage, ob die Ekg.-Befunde nach tierexperimentellen Lungenembolien die Möglichkeit zulassen, daß es sich um eine reflektorische Koronarinsuffizienz handelt, so kommen wir auf Grund obiger Versuchsergebnisse zu folgendem Schluß:

Von 27 Lungenembolien zeigen 9, die mit deutlichem Blutdruckabfall im großen Kreislauf reagierten, überhaupt *keine* Ekg.-Veränderungen, und zwar 1. während des Blutdruckabfalls selbst und 2. auch nach Wiederanstieg des Blutdrucks nicht. Das sind 30% der Gesamtfälle.

Weitere 8 Lungenembolie fälle zeigen elektrokardiographisch zwar Veränderungen, die im Sinne einer Koronarinsuffizienz liegen, die jedoch auch genau so gut durch den im rechten Ventrikel — mit seinen Folgen auf das Reizleitungssystem — erhöhten Blutdruck bzw. durch Strombehinderung im kleinen Kreislauf bedingt sein können, wie er bei Lungenembolien in den meisten Fällen nachgewiesenermaßen zustande kommt.

Auch eine andere Erklärung der Ekg.-Befunde muß hier noch erwähnt werden. Wie wir später noch zeigen werden, tritt infolge Blutdrucksenkung nach Lungenembolien des öfteren eine Anoxämie auf. Es genügt nun allein diese akute Anoxämie, um durch ihren Sauerstoffmangel im Gehirn eine Erregung auf das herzhemmende Vaguszentrum auszuüben, wie es von HEYMANS nachgewiesen wurde.

Sowohl die 9 Fälle ohne Ekg.-Veränderungen wie die 8 Fälle mit Kurven im Sinne einer Koronarinsuffizienz können also nicht als Begründung für eine reflektorische Koronarinsuffizienz nach Lungenembolien angesehen werden.

Mit derselben Begründung sind auch die restlichen 3 Fälle von Aufsplitterungen sowie Fälle, in denen Schenkelblockkurven auftraten, als Kronzeugen einer reflektorischen Koronarinsuffizienz abzulehnen, denn es ist eine bekannte Tatsache, daß schenkelblockartige Ekg.-Kurven durch Drucksteigerungen in dem einen oder anderen Ventrikel ohne weiteres auftreten können. Daß bei Lungenembolien ganz erhebliche Drucksteigerungen im rechten Ventrikel auftreten, zeigen die eingangs erwähnten Lungenembolieversuche mit Venendruckmessung. Auf Grund elektrokardiographischer Befunde bei experimentellen Lungenembolien von einem Erstickungstod durch reflektorische Koronarinsuffizienz zu

sprechen, erscheint auf Grund unserer Versuchsergebnisse sowie auf Grund unserer Ausführungen nicht möglich. Tatsache bleibt jedoch, daß die gefundenen Ekg.-Veränderungen, soweit sie überhaupt auftreten, ein Ausdruck der schlechten Herzmuskeldurchblutung sein können. Somit lag der Gedanke nahe, in der Herzmuskulatur selbst nach Anzeichen vorausgegangener unzureichender Koronardurchblutung zu suchen.

Was Kaninchen anbelangt, so wurden solche Anzeichen von WALDER und MEESEN bereits gefunden. Diese Autoren behaupten, daß tatsächlich nach vorübergehender Lungenembolie in der Herzmuskulatur von Katzen Nekrosen entstehen. Bei herzmuskelstarken Katzen sind die Nekrosen allerdings auch nach MEESEN geringer.

Da wir aus eigenen Erfahrungen bei Lungenembolien festgestellt hatten, daß Suspensionen wie Stärke, ebenso kleine Luftbläschen während der Lungenembolie in die Koronarvenen hineingepreßt wurden, führten wir die von MEESEN und anderen beschriebenen Nekrosen zunächst auf Koronarverstopfung zurück und wunderten uns nicht, nach Lungenembolien mit unserer eigenen Methode bei Katzen keine Nekrosen zu finden. Auf Vorschlag von BÜCHNER habe ich dann in späteren Versuchen die von BÜCHNER empfohlene Fixierung des Herzens nach SUSA vorgenommen und die Herzmuskulatur in Längsschnitten histologisch untersucht. Da bei unserer Methode (Blutemboli) ein Eindringen der Embolimasse in die Koronarvenen unmöglich war, erschienen uns diese Untersuchungen notwendig.

9 Herzen von Katzen, denen nach der Blutemboli-Methode in verschiedenen Schüben eine Lungenembolie gesetzt worden war, kamen zur histologischen Untersuchung und zwar: 1 Herz sofort nach der Embolie, 1 nach 5 min, 1 nach 2 Std, 1 nach 4 Std, 1 nach 9,5 Std, 1 nach 10 Std, 1 nach 15 Std und 2 nach 48 Std. Die Präparate wurden zur Hälfte mit Hämatoxylin und zur anderen Hälfte nach VAN GIESON gefärbt. Es seien 3 Versuche hier angeführt.

1. *Katze:* 11. 1. 39. Gewicht 3100 g. Narkose: Chloralose.

Der Katze wurden 2 Embolischübe gesetzt (2 + 22 Einzelemboli), welche beide zu vorübergehenden, aber deutlichen Blutdrucksenkungen führten. Nach 48 Std starb die Katze.

7. *Katze:* 8. 2. 39. Gewicht 3440 g. Dekapitiert und vagotomiert.

Die Katze stirbt sofort nach dem 3. Embolischub (10 + 10 + 15 Einzelemboli).

8. *Katze:* 14. 2. 39. Gewicht 3610 g. Narkose: Chloralose.

Doppelseitige Vagotomie. Der Katze werden 3 Embolischübe gesetzt (10 + 10 + 10 Einzelemboli). Exitus der Katze 9,5 Std nach dem 3. Embolischub. Nach jeder Embolie traten vorübergehende Blutdrucksenkungen auf.

Die histologischen Befunde waren folgendermaßen: 4 Katzenherzen — der Exitus erfolgte sofort, nach 5 min, nach 2 Std und nach 4 Std — zeigten eine normale Herzmuskelstruktur, keinerlei Nekrosen, keine anämischen Infarkte. Sämtliche Zellkerne waren tadellos erhalten. Auch bei den übrigen 5 Katzen, bei denen der Exitus später als nach 9 Std eintrat, fanden sich keine Nekrosen, sondern nur an ganz vereinzelten Stellen

leichte Strukturverwaschungen der Muskelfasern im rechten Ventrikel und im Septum.

Welche Bedeutung haben diese Befunde der Herzmuskulatur für die Frage nach der Todesursache bei Lungenembolien?

Regelrechte Infarkte waren überhaupt nicht zu finden, und zwar selbst bei den beiden Tieren nicht, die sich im Blutdruck wieder erholt hatten und erst nach 48 Std starben bzw. getötet wurden. Auch ein Kernverlust, leukozytäre Einwanderung, Eindringen von Fibroblasten usw. wurde nicht gefunden. Nach ASCHOFF heilen in der Herzmuskulatur selbst kleinere Infarkte meist glatt aus und bewirken selbst in größerer Zahl keine Störung der Herztätigkeit. Es brauchen nun natürlich frisch abgestorbene Zellen keine Veränderungen der Struktur aufzuweisen, man müßte jedoch erwarten, daß bei den Tieren, die noch 15 Std oder gar 48 Std weiterlebten, zum mindesten einwandfreie Anzeichen einer beginnenden Nekrose zu finden wären. Das ist jedoch, wie wir oben bereits erwähnt haben, nicht der Fall und somit glauben wir zu folgendem Schluß zu kommen:

Die nach künstlich gesetzten Lungenembolien auftretenden Veränderungen in der Herzmuskulatur an Katzen sind so geringfügiger Natur, daß sie als Todesursache nach Lungenembolien unter keinen Umständen in Frage kommen können. Gleichzeitig sprechen die histologischen Befunde dagegen, daß es bei Lungenembolien zu bedeutenden und länger anhaltenden Koronarkrämpfen kommt.

Unterschiede in histologischer Beziehung wurden beim Vergleich nichtvagotomierter, vagotomierter und dekapitierter Katzen nicht gefunden. Damit erscheint die Auffassung, daß es nach Lungenembolien infolge Vagusreizung zur Koronarinsuffizienz kommt, ebenfalls als unwahrscheinlich.

Lehnen wir damit als Todesursache bei Lungenembolien eine isolierte Minderdurchblutung des Herzmuskels durch Reflexe ab, so wäre noch zu entscheiden, ob der Organismus an allgemeinem Sauerstoffmangel, an einer Anoxämie zugrunde geht.

Wir haben nun zwecks Klarstellung dieser Frage an 4 Hunden und 2 Katzen *gasanalytische Untersuchungen* angestellt, um den Grad der eventuellen Zyanose festzustellen, die ja, falls es sich um einen Erstikkungstod handelt, nach BETHE ganz minimale Sauerstoffwerte ergeben muß (1 Vol.-% für Hunde).

Besprechung der gasanalytischen Untersuchungen an Hunden und Katzen.

Betrachten wir zunächst die 4 Hundeversuche, so kann allgemein folgendes festgestellt werden:

1. Eine wesentliche Erniedrigung der Sauerstoffwerte im arteriellen Blut ohne gleichzeitige Blutdrucksenkung bei tierexperimentellen Lungenembolien kommt nicht vor.

2. Der arterielle Blutdruck kann vorübergehend bei Lungenembolien absinken, ohne daß sich die Sauerstoff-Kohlensäurewerte im arteriellen Blute ändern.

1. *Hund, 13. 10. 38. Gewicht 28 kg. Narkose: Chloralose.*

Zeit der Blutentnahme	O_2 in Vol%	CO_2 in Vol%	Blutdruck mm Hg	Kreislauferscheinungen
Blutprobe				
1. Vor der Embolie	15,2	38,1	142	
2. 30 sec n. 1. E. . .	18,2	37,0	142	Keine
3. 30 sec n. 2. E. . .	17,5	39,2	110	Blutdruck-Tiefstand erreicht, Blutdruck ist seit 15 sec abfallend
4. 30 sec n. 3. E. . .	20,1	39,2	110	Blutdruck fällt seit 10 sec
5. 4 min n. 3. E. .	20,0	37,0	100	Blutdruck steht seit 4 min auf 100 mm Hg
6. 8 min n. 3. E. .	20,0	38,0	100	Blutdruck unverändert
7. 30 sec n. 4. E. . .	10,3	39,0	60	Atmung deutlich langsam
8. 5 min n. 4. E. .	16,0	35,0	60	Blutdruck seit 5 min 60 mm

Der Hund wird später durch Luftembolie getötet.

2. *Hund, 21. 10. 38. Gewicht 15 kg. Narkose: Chloralose.*

Zeit der Blutentnahme	O_2 in Vol%	CO_2 in Vol%	Blutdruck mm Hg	Kreislauferscheinungen
Blutprobe				
1. Vor der Embolie	19,0	35,0	120	
2. 1 min n. 1. E. . .	13,0	37,0	60	Blutdruck seit 1 min abgefallen
3. 1 min n. 2. E. . .	15,0	38,0	40	Blutdruck fällt dauernd, Atmung langsam u. krampfhaft
4. 3 min n. 2. E. . .	8,8	50,7	30	Blutdruck fällt weiter, noch einzelne Atemzüge
5. 5 min n. 2. E. . .	3,2	48,0	0	Atmung erloschen, Thorax geöffnet, Herz punktiert

3. *Hund. Gewicht 7 kg. Narkose: Chloralose.*

Zeit der Blutentnahme	O_2 in Vol%	CO_2 in Vol%	Blutdruck mm Hg	Kreislauferscheinungen
Blutprobe				
1. Vor der Embolie	19,4	38,0	110	
2. 1,25 min n. d. E.	5,2	54,6	40	Blutdruck seit 1 min im Fallen Atmung stockend
3. 2,25 min n. 1. E. .	4,1	51,0	30	Blutdruck sinkt weiter
4. 4,25 min n. 1. E. .	4,4	53,0	20	Blutdruck steht auf Tiefstand, nach 4 min jedoch wieder auf 110
5. Vor der 2. E. . .	16,3	49,0	110	
6. 1 min n. 2. E. . .	2,18	53,0	fast 0	Nur noch einzelne Atemzüge

4. *Hund, 1. 12. 38. Gewicht 10 kg. Narkose: Chloralose.*

Zeit der Blutentnahme	O_2 in Vol%	CO_2 in Vol%	Blutdruck mm Hg/ mm H_2O	Kreislauferscheinungen
Blutprobe				
Vor der Embolie . .	18,0	41,0	95/6	Keine
1. 80 sec n. 1. E. . .	10,0	47,0	40/100	Arterieller Blutdruck steigt danach sofort wieder an, Atmung noch stockend
2. 2 min n. 1. E. .	15,0	43,0	95/16	Blutdruck ohne Befund
3. 10 min n. 1. E. .	20,0	38,0	100/16	Blutdruck ohne Befund
4. 80 sec n. 2. E. . .	5,0	49,0	30/230	Nur noch kleine vereinzelte Atemzüge
5. 3 min n. 2. E. .	3,0	48,0	15/230	Atmung fast erloschen

Bei diesem Hund wurde außer dem arteriellen auch der venöse Blutdruck (in mm H_2O) gemessen.

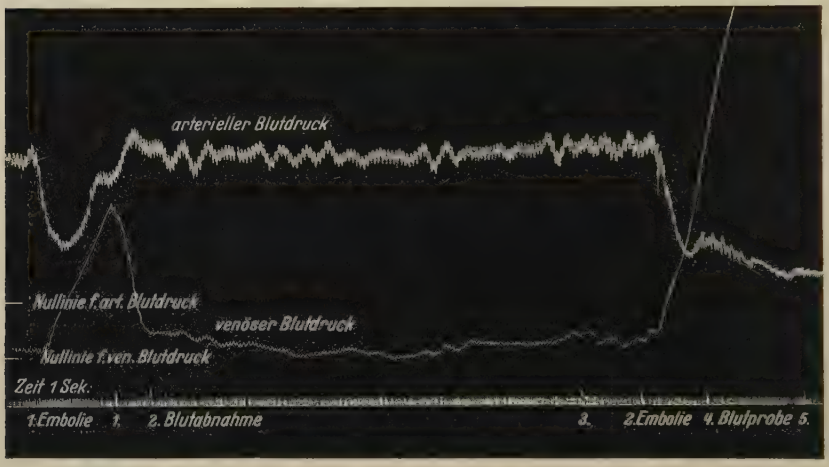


Abb. 5. Hund, 1. 12. 38. 2 Lungenembolieseetzungen mit Messung des arteriellen und venösen Blutdrucks. Bei 1, 2, 3, 4 und 5 der Abbildung wurde jeweils Karotisblut zur Gasanalyse entnommen. Das Verhältnis von O_2 : CO_2 ergab bei 1 = 10: 47 Vol%, bei 2 = 15: 43 Vol%, bei 3 = 20: 38 Vol%, bei 4 = 5: 49 Vol% und bei 5 = 3: 48 Vol%.

1. *Katze, 15. 3. 39. Gewicht 2680 g. Narkose: Chloralose.*

Zeit der Blutentnahme	O_2 in Vol%	CO_2 in Vol%	Blutdruck mm Hg
Blutprobe			
1. Vor der 1. Embolie	19,0	32,0	140
2. 20 sec n. d. 1. E.	16,5	35,8	110
3. 2 min n. d. 1. E.	18,7	32,3	140
4. 7 min n. d. 1. E.	17,6	34,7	140
5. 30 sec n. d. 3. E.	15,6	34,3	90
6. 1,5 min n. d. 3. E.	17,5	36,5	140
7. 4,5 min n. d. 3. E.	12,2	41.6	140
8. 6,5 min n. d. 3. E.	14,2	40,1	140

2. Katze, 17. 3. 39. Gewicht 2370 g. Narkose: Chloralose.

Zeit der Blutentnahme	O_2 in Vol%	CO_2 in Vol%	Blutdruck mm Hg
Blutprobe			
1. Vor der Embolie	12,9	35,6	140
2. Vor der 1. Embolie	12,4	36,7	140
3. 1,5 min n. 1. E.	12,4	38,2	100
4. 3,5 min n. 1. E.	13,2	38,2	110
5. 6,5 min n. 1. E.	12,4	44,6	100
6. 16,5 min n. 1. E.	12,4	46,9	90

Beim 1. Hund tritt nach dem 2. Embolischub eine Blutdrucksenkung von 142 auf 110 mm Hg auf und nach dem 3. Embolischub eine solche von 110 auf 100 mm Hg, ohne daß sich Sauerstoff- und Kohlensäurewerte im arteriellen Blut wesentlich ändern. Erst nach dem 4. Embolischub und gleichzeitiger Blutdrucksenkung auf 60 mm Hg tritt vorübergehend ein Sauerstoffdefizit auf (7. Blutprobe = 10,3 Vol% O_2: 39,0 Vol% CO_2), das sich jedoch trotz Stehenbleibens des Blutdrucks auf 60 mm Hg bereits nach 5 min wieder ausgeglichen hat. Die Atmung war vorübergehend stockend. Der Hund wurde später, nachdem der Blutdruck wieder angestiegen war, getötet.

Beim 2. Hund tritt, nachdem der arterielle Blutdruck bereits seit 1 min nach der 1. Embolie von 120 auf 60 mm Hg abgefallen war, eine Erniedrigung der O_2-Werte von 19 auf 13 Vol% ein. Nach einem weiteren Embolischub von 15 Einzelemboli — der Blutdruck hatte sich nach der 1. Embolie seit 10 min bereits wieder erholt — tritt eine ähnliche Sauerstofferniedrigung auf, nämlich auf 15 Vol%, wobei der arterielle Blutdruck bereits von 120 auf 40 mm Hg abgesunken war und sich von nun an dauernd weiter senkte. Die Atmung war bereits stockend, die Anzahl der Atemzüge pro Minute wurde immer geringer. Im weiteren Verlauf sinkt der O_2-Wert nach 3 min auf 8,8 Vol% (bei Blutdruck 30 mm Hg) und zeigt schließlich nach Erlöschen der Atmung im linken Ventrikelblut einen Wert von 3,2 Vol% O_2 und 48,0 Vol% CO_2. Der Tod des Tieres war bereits 1 min nach der 2. Embolie bei einem Blutdruck von 40 mm Hg unvermeidlich besiegelt. In diesem Moment fand sich im arteriellen Blut noch ein O_2-Wert von 15 Vol%, was zwar erniedrigt ist, aber niemals als ernstes Sauerstoffdefizit gewertet werden kann. Es ist zu bedenken, daß in Narkose die O_2-Sättigung um etwa 10 bis 15% geringer ist als normal (Bethe). Zum Schluß versagen Kreislauf und Atmung immer mehr, dementsprechend gehen auch die arteriellen Sauerstoffwerte in ein erhebliches Defizit über.

Beim 3. Hunde tritt bereits nach dem 1. Embolischub eine bedrohliche Senkung des Blutdrucks bis auf 20 mm Hg sowie der arteriellen Sauerstoffwerte auf 4,4 Vol% auf, die sich jedoch nach weiteren 4 min wieder ausgeglichen haben (16,3 : 49, Blutdruck 110 mm Hg). Die Atmung war während der Blutdrucksenkung schlecht, Atemzüge selten und krampfhaft. Nach einer 2. Embolie sinken Blutdruck und Sauerstoffgehalt sofort wieder stark ab, nämlich der Blutdruck 1 min nach der 2. Embolie auf fast 0, der O_2-Wert auf 2,18 Vol% und der CO_2-Wert auf 53 Vol%. Nach nur noch wenigen Atemzügen kam es zum Atemstillstand.

Der Versuch zeigt, daß bei starkem Blutdruckabfall auch erhebliche Sauerstoffdefizite auftreten. Er zeigt jedoch andererseits die Möglichkeit, daß Sauerstoffwerte von 4,4 Vol% und Blutdrucksenkungen von 110 auf 20 mm Hg bei Lungenembolien noch wieder ausgeglichen werden können.

Der 4. Hund zeigt ähnliche Erscheinungen. Bei einem Blutdruckabfall von 95 auf 40 mm Hg und einem Venendruckanstieg von 6 auf 100 mm H_2O sinkt der O_2-Gehalt im Blute von 18 auf 10 Vol%. Mit Ausgleich des Blutdrucks werden auch die

Sauerstoffwerte wieder normal. Nach der 2. Embolie sinkt der Blutdruck auf 30 mm Hg, der Venendruck steigt auf 230 mm H_2O an, trotz dieser ungeheuren Kreislaufverschlechterung finden wir noch 5 Vol% Sauerstoff im arteriellen Blut. Beim Absterben des Tieres sinkt der Blutdruck bis auf 15 mm Hg und der O_2-Wert auf 3 Vol%, dabei ist die Atmung fast erloschen.

Auch dieser Versuch zeigt, daß eine Sauerstofferniedrigung im arteriellen Blut ohne Blutdruckabsinken nicht vorkommt, wenn die Atmung normal bleibt. Er zeigt ferner, daß eine verschlechterte Atmung bei Lungenembolien als Folge des Blutdruckabfalls angesehen werden muß.

Die letzten beiden gasanalytischen Untersuchungen bei tierexperimentellen Lungenembolien wurden an Katzen durchgeführt. Auch hier zeigt sich dasselbe Bild, wie wir es bei den Hundeversuchen gesehen haben. Leichtere Blutdrucksenkungen nach Lungenembolien rufen noch keine wesentliche Anoxämie hervor. Gewisse Schwankungen der O_2- und CO_2-Werte im Blute müssen hierbei als Narkosefolgen angesehen werden.

Bei Betrachtung der gesamten gasanalytischen Untersuchungen ist es also auffällig, daß trotz Absinken des Blutdrucks der O_2-Gehalt des Blutes nicht abzufallen braucht, daß überhaupt das Verhältnis $O_2 : CO_2$ sich unter Umständen gar nicht ändert.

Von diesen beiden Symptomen, der Blutdrucksenkung und der Sauerstoffminderung im arteriellen Blut tritt als *erstes* immer die Blutdrucksenkung auf, sie hat, falls größere Ausmaße erreicht werden, auch stets eine Sauerstoffherabsetzung zur Folge.

Man kann also zweifellos mit Recht behaupten, daß das *Sauerstoffdefizit* im arteriellen Blut nach Lungenembolien eine *Folge* der *Blutdrucksenkung* ist.

Wollen wir nun die Frage beantworten, ob der Tod bei Lungenembolien ein allgemeiner Erstickungstod ist, so kommen wir zu dem Schluß, daß bei stärkeren Lungenembolien eine Anoxämie zustande kommt, die auf die Dauer vom lebenden Organismus nicht ertragen werden kann. Da sie jedoch sekundärer Natur ist, scheidet sie als eigentliche Todesursache aus. Als Grund für die Anoxämie muß die Blutdrucksenkung und damit ine allgemeine Verschlechterung des Kreislaufs angesehen werden.

Gesamtergebnis der Versuche.

Wenn wir auf Grund vorliegender Untersuchungen nun zu dem Schluß gekommen sind, daß weder Blutgifte wie Histamin noch nachweisbare Reflexe die eigentliche Todesursache bei Lungenembolien darstellen, und daß auch ein Erstickungstod als primäre Ursache ausgeschlossen werden kann, so erhebt sich nunmehr die eigentliche Frage, woran denn der Organismus bei tödlichen Lungenembolien zugrunde geht.

Wir haben gezeigt, daß all die bekannten Symptome, wie Ekg.-Veränderungen, geringe histologische Veränderungen in der Herzmuskulatur sowie die Anoxämie letzten Endes nur als Folge des Blutdruckabfalls im linken Herzen bzw. der Druckerhöhung im rechten Herzen anzusehen

sind. Nach dieser Feststellung können wir die Frage nach der Todesursache dahin spezialisieren: „*Warum kommt es zu einem Blutdruckabfall im linken* und warum zu einem *Blutdruckanstieg im rechten Herzen.*“

Wir werden nun zeigen, daß es von ausschlaggebender Bedeutung für das Verhalten des Blutdrucks ist, was für ein Kanalsystem dem Herzen im Lungenkreislauf zur Verfügung gestellt wird, wenn es verschiedenen Ansprüchen gerecht werden soll.

Das Herz eines jeden Tieres verfügt über eine ganz bestimmte Kraft, der eine gewisse Grenze gesetzt ist. Diese Kraftkapazität erlaubt es, bestimmte Druckverhältnisse zu überwinden. Arbeitet das Herz z. B. mit halber Kraftkapazität, so ist es ohne weiteres in der Lage, gewisse Stromhindernisse, also einen höheren Druck infolge Einengung des Lungenkreislaufs zu bewältigen, wenn dieser höhere Druck innerhalb der Kraftkapazität liegt. Je kleiner die im Augenblick benötigte und geleistete Herzarbeit ist, desto größer sind die Reserven. Liegen nun bei der Lungenembolie die Verhältnisse so, daß die Strombehinderung durch den Embolus, d. h. daß die Aufrechterhaltung des Blutdrucks durch Einsatz der Herzreservekraft ohne weiteres und sofort ausgeglichen werden kann, so kommen wir zu dem Bilde der Lungenembolie, welche keine Kreislauferscheinungen zeigt. Ist das Stromhindernis aber größer, d. h. werden eine größere Anzahl von Einzelemboli injiziert, so daß die Herzreservekraft nicht in der Lage ist, sofort einen Ausgleich zu schaffen, so treten Kreislauferscheinungen auf, die durch Versagen der Herzkraft zum Tode führen können. Führen die Kreislauferscheinungen nicht zum Tode, so liegt das einzig und allein an den Lungengefäßen.

Besitzt das Lungengefäßsystem die Fähigkeit, große Stromhindernisse durch Einschaltung vorher nicht funktionierender Kapillargebiete oder Kapillaren zu umgehen, so wird damit dem Herzen ein Teil seiner Arbeit abgenommen und die Kreislauferscheinungen werden in kürzester Zeit wieder ausgeglichen sein.

Es kommt also bei der Entscheidung, ob ein Embolus tödlich wirkt oder nicht — abgesehen von der Herzkraft — dann nur auf die zur Verfügung stehenden Reserven an Kapillaren an. Sind sie nicht vorhanden, oder treten sie zu langsam in Funktion, so wird das Stromhindernis nicht ausgeglichen und es folgt eine weitere Blutdrucksenkung, an deren Folgen der Organismus zugrunde geht.

Wenn ich oben von Reservekapillaren der Lunge sprach, so soll das nicht heißen, daß wir hier von einer Hypothese ausgegangen sind. In seinen anatomisch-physiologischen Untersuchungen hat Gaida den Nachweis von Reservekapillaren in der Lunge erbracht.

Ein Beispiel für allmähliches Infunktiontreten von Kapillarreserven ist der Embolieversuch an Katze Nr. 14.

Hier gelang es durch Einschaltung größerer Pausen der Katze eine 3fache tödliche Embolimenge zu injizieren, ohne daß der Tod eintrat.

Ähnliche Verhältnisse liegen klinisch vor, wenn eine langsam fortschreitende massive Thrombose der Art. pulmon. entsteht, die nach Beobachtungen von L. FAUVET und MONSAIUGEN z. B. bei Schwindsüchtigen nur geringe funktionelle Symptome auslöst.

Daß es bei Lungenembolien zu einem oft um das zehnfache erhöhten Venendruck kommt, liegt an der Unfähigkeit des Herzens, die an sich noch zur Genüge vorhandenen Reservekapillaren für die Blutdurchströmung freizubekommen. Diese Unfähigkeit ist jedoch nur bedingt vorhanden. Der eigentliche Grund für das Versagen des Herzens liegt in dem Verhalten der Lungenkapillaren. Sind genügend funktionstüchtige Reservekapillaren vorhanden, so braucht das Herz nicht zu versagen.

Danach müßte es gelingen, bei Tieren durch künstlich herbeigeführte starke Durchblutung der Lungen alle Reservekapillaren funktionsbereit zu machen. Dies ist in der Tat bereits gelungen. STRAUSS führte an Kaninchen trainingsmäßige Laufversuche durch. Bei Laufarbeit über 3 bis 9 Wochen kam es infolge starker Beanspruchung der Lunge und des Herzens zu einer Gewichtszunahme der Lunge, des Zwerchfells und zu einer Hyperthrophie besonders des rechten Ventrikels.

Bei Tieren mit 100% funktionstüchtig gemachten Reservekapillaren muß es dann auch gelingen, plötzlich die Embolimenge ohne tödliche Folgen zu injizieren, die bis zu zwei Drittel der Lungenstrombahn ausschaltet.

Was für die Gefäßkapillaren gilt, gilt auch in ähnlichem Maße für die Lungenalveolen. Auch von ihnen wird ein Teil bei jeder Embolie ausgeschaltet werden und auch hier würde die Fähigkeit der Umstellung im wesentlichen davon abhängen, ob funktionstüchtige Reservealveolen zur Verfügung stehen oder nicht. Ob bei der Infunktionssetzung der Reservekapillaren oder Alveolen irgendwelche örtlichen hemmenden Reflexe eine Rolle spielen, ist unbekannt, aber nach den bisherigen Kenntnissen nicht anzunehmen.

Kommt es bei Lungenembolien zum tödlichen Ausgang, obwohl rein anatomisch noch genügend Lungengewebe und Gefäße zur Verfügung stehen, so ist in erster Linie die mangelhafte Funktionstüchtigkeit der Reservekapillaren daran Schuld.

Zusammenfassung des experimentellen Teiles.

In zahlreichen Tierversuchen wurde nach der Ursache der tödlichen Lungenembolie geforscht und dabei folgendes festgestellt:

1. Die Menge der Emboli hat einen wesentlichen Einfluß auf den Verlauf der Lungenembolie an Hunden und Katzen.

2. Blutgifte, soweit sie heute bekannt und nachweisbar sind, werden bei der Lungenembolie nicht in den Kreislauf ausgeschüttet.

3. Ein Beweis, daß es sich bei der tödlichen Lungenembolie um einen Reflextod handelt, kann nicht erbracht werden.

4. Eine Erstickung als eigentliche Todesursache bei Lungenembolien ist auf Grund gasanalytischer, elektrokardiographischer und histologischer Untersuchungen abzulehnen.

5. Die Entscheidung, ob Lungenembolien, bei denen nach der Embolie an sich noch genügend Lungengewebe zur Durchströmung und Durchlüftung vorhanden ist, zum Tode führen oder nicht, hängt von der zur Verfügung stehenden Reserve an funktionstüchtigen Kapillaren und Alveolen der Lunge ab.

Klinischer Teil.

Von den Fragen, die wir im Tierexperiment über die Lungenembolie gestellt und beantwortet haben, erschien uns am Menschen die Frage nach dem Erstickungstod als am wenigsten geklärt und damit am wichtigsten.

Bei den an Lungenembolie erkrankten Patienten ist es besonders auffällig, daß sie nicht jenen Grad der äußerlichen Zyanose aufweisen, wie man ihn auf Grund der bisher bekannten physiologischen Vorgänge und Anschauungen erwartet hatte.

Wir haben nun ähnlich wie in unseren Tierexperimenten versucht, den Grad der Zyanose bei menschlichen Lungenembolien durch gasanalytische Bestimmungen des Blutes zahlenmäßig festzustellen.

An 3 tödlichen sowie 2 nichttödlichen Lungenembolie fällen wurden Gasanalysen angestellt.

1. Fall: Frau N. (877/37), 59 Jahre, Grundleiden: Inoperables Portiokarzinom. Therapie: Röntgen-Radium. Morgens beim Aufstehen plötzlich die bekannten Anzeichen einer schweren Lungenembolie. 10 min nach der Lungenembolie wird durch Punktion des li. Ventrikels eine Blutprobe entnommen. 5 min später tritt der Exitus ein.

Befunde: Hämoglobin 75%, Temperatur 36,8°, Puls 78, Blutdruck vor der Embolie nach R. R. 125/80. Der Puls betrug während der Herzpunktion 60.

Die Pat. zeigte nur noch vereinzelte krampfhafte Atemzüge; der Blutdruck ist nach R. R. nicht mehr zu messen. $O_2 : CO_2$ im li. Ventrikel = 5,45 : 38,15 Vol%.

2. Fall: Frau T. (1362/40), 59 Jahre. Grundleiden: Ca des corpus uteri. 7 Tage nach vaginaler Totalexstirpation des Uterus treten beim Umbetten plötzlich Erscheinungen einer schweren Lungenembolie auf.

Befunde: Vor der Embolie Puls 90, Temperatur 37°, Hb. 89%. Um 17 Uhr Embolie, 5 min später tritt der Exitus ein. 1 min *nach* Aufhören der Atmung wird eine Herzpunktion des li. Ventrikels zwecks Blutentnahme vorgenommen und die Blutgase nach VAN SLYKE bestimmt.

Wir fanden $O_2 : CO_2$ im li. Ventrikel = 9,5 : 47,5 Vol%. Sektionsbefund: *Massive* Lungenembolie mit Verlegung *beider* Pulmonalarterienäste, kleiner frischer häm. Infarkt im re. Oberlappen. Re. Herz akut dilatiert. Histologisch: keine Nekrosen.

3. Fall: Frau B. (432/41) 8 Wochen post partum. Grundleiden: Mastitis.

Am 21. März 1941 Inzision einer nekrotisierenden mastitis.

Am 26. März 1941 plötzlich stechende Schmerzen in der li. Brustseite, krampfhafte Atmung, blaßzyanotischer Ton der Schleimhäute. Diagnose: Lungenembolie li.

Befunde: Puls vorher 90, Temperatur 37°, Blutdruck nach R. R. 137/75. Nach der Embolie: Puls 108, Temperatur 38,8°, Pat. erholt sich wieder, nach 3 Tagen ist der Puls und die Temperatur wieder normal.

5 Tage nach dieser überstandenen Lungenembolie erneuter Anfall von Kurzatmigkeit mit starken Schmerzen in der re. Brustseite. Auch dieser Lungenembolieanfall wird überstanden.

Am 1. April 1941 um 17 Uhr erfolgt der 3. Embolieschub mit stechenden Schmerzen besonders in der re. Seite. Diagnose: Akuter Anfall einer rechtsseitigen Lungenembolie. Die Pat. zeigt kalten Schweiß auf der Stirn, wird kurzatmig und zeigt blaßzyanotische Schleimhäute.

2 Std nach der Lungenembolie Blutentnahme durch Freilegen der li. Arteria radialis. Puls dabei 140 pro Minute. Atmung 44 pro Minute. Blutdruck nach R. R. 60—70 mm Hg. Der Sauerstoffwert des arteriellen Blutes beträgt 10,3 Vol%, der CO_2-Wert 48,4 Vol%. 30 min später Exitus. Sektionsbefund: Ältere Embolie der li. Pulmonalis mit mehreren häm. Infarkten im Unter- und Oberlappen li. Fibrinöse Begleitpleuritis über den infarzierten Lungenabschnitten. Massive Embolie der re. Art. Pulmon. mit völligem Verschluß des Lumens bis in die kleineren Äste. Geringe warzige Verdickung der Mitralis. Akute Dilatation des re. Herzens. Zarte Kranzgefäße. Der Embolus stammt aus der re. Schenkelvene.

2 Fälle von vorübergehender Lungenembolie.

1. Fall: Frau K. (869/37), 42 Jahre. Grundleiden: Descensus vaginae. Status: 14 Tage nach einer vaginalen Plastikoperation. Pat. steht seit 2 Tagen auf. Blutdruck nach R. R. 135/70, Puls 74 pro Minute.

Am Tage der Lungenembolie tritt morgens eine Thrombose des li. Beines auf. Abends 19 Uhr typische Erscheinungen einer Lungenembolie mit Stechen in der Brust, kalter Schweiß, krampfhafte Atmung. Der Blutdruck beträgt während des Anfalls 115/80, Puls 106, Atmung 19 pro Minute. Die Arterienpunktion ergibt einen Sauerstoffgehalt von 19,2 Vol% und einen CO_2-Gehalt von 43,7 Vol%. Im venösen Blut: $O_2 = 10{,}5$ und $CO_2 = 50$ Vol%. Der Blutdruck ist nach 3 Tagen wieder 130:90.

2. Fall: Frau H. (302/37), 41 Jahre. Grundleiden: Myom des graviden Uterus, vor 8 Tagen durch Lap. enukleiert. Temperatur vorher 37°, Puls 80, Blutdruck 130 : 80. Pat. bekommt plötzlich Stechen in der re. Brust, Angstschweiß auf der Stirn. Der Blutdruck beträgt während des Anfalls 105 : 70, der Puls 7 min nach Beginn der Embolie 120. Die Arterienpunktion ergibt 7 min nach Beginn der Embolie einen Sauerstoffwert von 18,4 Vol% und einen CO_2-Wert von 35,28 Vol%. Im venösen Blut findet sich ein O_2-Wert von 14,93 und ein CO_2-Wert von 39,4 Vol%. 4 Tage nach der Embolie ist der Blutdruck wieder 135 : 80.

Vergleichsfall: Frau Dr. (837/37), 57 Jahre. Grundleiden: Portio-Ca mit Metastasen in der Leber. Karzinomanämie: Hb = 30—40%. 3 Tage vor dem Exitus hat die Pat. in der Radialarterie einen Sauerstoffgehalt von 6,33 Vol% und einen CO_2-Gehalt von 41,35 Vol%. In der Vene ist der Sauerstoffgehalt = 3,32 und der CO_2-Gehalt = 43,99 Vol%. Der Blutdruck nach R. R. = 110 : 65, Puls = 90, Temperatur = 36,5°.

Besprechung der klinischen Fälle.

Betrachten wir zunächst einmal die Fälle mit vorübergehenden Erscheinungen einer Lungenembolie.

Bei ihnen hat sich der Sauerstoffgehalt im arteriellen Blut nicht wesentlich geändert.

Im Gegensatz zu diesen nichttödlich verlaufenen Lungenembolien zeigen die 3 Fälle mit tödlichem Ausgang doch erhebliche Sauerstoffdefizite im arteriellen Blut.

Betrachten wir die Erscheinungen der gesamten Fälle, so ergibt sich, daß als erstes und sicherstes Zeichen nach klinisch erkennbaren Lungenembolien immer eine Blutdrucksenkung auftritt, und zwar auch dann, wenn die O_2-Werte im arteriellen Blut noch völlig normal sind. Erst sekundär tritt eine verschlechterte Atmung ein, die auch ein O_2-Defizit zur Folge hat.

Ebenso wie bei Tieren wird also auch beim Menschen die durch die schlechte Atmung bedingte Zyanose noch verstärkt durch die auftretende Lungenstauung.

Es erübrigt sich, auf die histologischen Befunde des klinischen Materials einzugehen, denn Strukturveränderungen in der Herzmuskulatur treten im allgemeinen 15 min nach Beginn einer Kreislaufschädigung mit anschließendem Exitus nicht auf, wir haben auch keine gefunden. Werden tatsächlich beim Menschen nach tödlichen Lungenembolien irgendwelche Nekrosen gefunden, so werden sie in den allermeisten Fällen als Folge der schon vorher bestandenen Herzfehler angesehen werden müssen: Wir haben auch im 3. Fall, wo bereits 11 Tage vor der Embolie eine *vorübergehende* Lungenembolie aufgetreten war und sich bei der Sektion bereits ältere Infarkte fanden, keine Nekrosen gefunden.

Gehen wir auf Grund dieser klinischen Fälle und auf Grund bekannter klinischer Erscheinungen die Möglichkeiten durch, die sich zur Lösung des Embolieproblems ergeben, so kommen wir zu folgendem Ergebnis:

Für einen *Erstickungstod* sind die von uns gefundenen O_2-Werte im linken Ventrikelblut oder im Blute der peripheren Arterien bei tödlichen Lungenembolien trotz ihrer erheblichen Defizite noch zu hoch. Vorübergehende leichtere Lungenembolien zeigen so gut wie gar keine Änderungen der Sauerstoffwerte im arteriellen System. Bei den tödlichen Lungenembolefällen fanden sich Sauerstoffwerte von 9,55, 10,3 und 5,45 Vol.-%. Selbst 5,45 Vol.-% ist als vorübergehender O_2-Wert bei anderen Erkrankungen bekannt und braucht nicht unbedingt Todesursache zu sein. Vor allen Dingen ist es unmöglich, bei Todesfällen auf Grund einer Erstickung noch 1 min *nach* dem *Exitus* einen Sauerstoffwert von 9,5 Vol.-% vorzufinden.

Die Annahme eines *Reflextodes* ist nicht zu beweisen. Alle Erscheinungen, die für einen Reflextod nach Lungenembolien sprechen könnten, wie elektrokardiographische und histologische Veränderungen, können ohne weiteres durch die allgemeine Blutdrucksenkung erklärt werden. Ferner spricht auch die nach Lungenembolien häufig auftretende Pulsfrequenz* gegen einen Vagusreflextod. Auch Ausschaltungsversuche der Reflexe durch hohe Atropindosen blieben ohne Erfolg. Ob die neuerdings empfohlene Eupaverintherapie zu wesentlichen Erfolgen führt, muß abgewartet werden.

---

* Was das Verhalten der Pulszahl anbetrifft, so wäre es möglich, daß die Pulsbeschleunigung zum Teil durch den Bainbridge-Reflex bedingt ist, der bei stärkerem Blutzufluß zu den großen präkardialen Venen infolge Dehnung der Gefäßwände zustande kommt.

Die letzte Möglichkeit der Todesursache bei Lungenembolien wäre ein *reiner Herztod.* Da letzten Endes die Herzkraft ja immer das Ausschlaggebende bleibt und auch die Sektionsbefunde nach tödlichen Lungenembolien oft eine Dilatation des rechten Herzens ergeben, kann man gegen diese Erklärung nichts einwenden. Doch scheint uns im Versagen des Herzens nicht das eigentliche Kernproblem der tödlichen Lungenembolie zu liegen. Wir haben zu ergründen, weshalb das nach einer Lungenembolie übrigbleibende Lungengewebe, also sowohl Kapillaren wie Alveolen, nicht zum Ausgleich des Stromhindernisses herangezogen wird.

Wir glauben allen Grund für die Annahme zu haben, daß dieselben Vorgänge, wie sie im Tierexperiment auftreten, auch in ähnlicher Weise für die menschlichen Lungenembolien zutreffen. Auch die menschliche Lunge verfügt über gewisse Reservekapillaren und Alveolen, die bei Bedarf zur Kompensation von Stromhindernissen mit eingesetzt werden und so zur Vergrößerung der respiratorisch wirksamen Blutoberfläche beitragen. Von diesen Reservekapillaren werden bei der Lungenembolie zunächst diejenigen eingesetzt, die funktionstüchtig sind. Sind zur Kompensation des Stromhindernisses alle funktionstüchtigen Reservekapillaren herangezogen, so tritt die kritische Phase ein. Jetzt sind nur noch solche Reservekapillaren in der Lunge vorhanden, die vorher noch nie oder nur selten in Funktion gestanden haben. Das Infunktionbringen dieser untrainierten Reservekapillaren stellt gewaltige Anforderungen an die Herzkraft, die dann häufig versagt.

Der eigentliche Grund, weshalb es also zum Versagen des Herzens kommt, liegt in der *nicht* vorhandenen Funktionsbereitschaft der Reservekapillaren sowie der Reservealveolen. Das Herz wird um so mehr versagen, als infolge der Blutdrucksenkung erstens eine Atemstockung und zweitens eine Anoxämie eintritt.

Dasselbe, was für die Kapillaren gilt, gilt auch für die Alveolen. Auch hier ist es verständlich, daß Patienten mit Thoraxdeformitäten, Tbc.-Schrumpfungen, Zysten, emphysematischen Bezirken, traumatischen Veränderungen u. a. nicht in demselben Maße in der Lage sind, Reservealveolen schnell wieder in Funktion zu bringen wie gesunde Lungen.

Literatur.

ASCHOFF: Pathologische Anatomie. Jena: G. Fischer 1936. — BALOGH: Dtsch. med. Wschr. **1940**, 6. — BARCROFT: Die Atmungsfunktion des Blutes. Berlin: Springer 1927. — BARTOSCH: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 176. — BECHER: Lehrb. d. pathol. Physiol. Jena: G. Fischer 1937. — BETHE-BERGMANN: Handb. d. norm. u. pathol. Physiol. Berlin: Springer 1925. — BÜCHNER: Klin. Wschr. **1938**, 49, 40; Die Koronarinsuffizienz. Kreislaufbücherei, Bd. 3. Dresden: Th. Steinkopf 1939. — BURN: Biologische Auswertungsmethoden. Berlin: Springer 1937. — CODE, C. F.: J. Physiol. (Brit.) **89**, 257 (1936). — DIETRICH u. SCHWIEGK: Klin. Wschr. **1933**, 135. — DENK: Münch. med. Wschr. **1938**, 1630. — ECKARDT: Pflügers

Arch. **1939**, 241. — Eppinger: Wien. klin. Wschr. **1935**, 2, 3. — Fauvet, I., u. A. Monsaiugen: Z. f. Gynäk. **1940**, 25. — Frey: Die Embolie. Leipzig: G. Thieme 1933. — Gaddum: Gefäßerweiternde Stoffe der Gewebe. Leipzig: G. Thieme 1936.— Gaida, Max: Anat. Anz. **89**, 52—65 (1939). — Geissendörfer: Thrombose und Embolie. Leipzig: J. A. Barth 1935. — Hachmeister: Z. exper. Med. **6**, 780 (1941); Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **197**, 130 (1941). — Haselhorst: Arch. Gynäk. **1924**, 122. — Hochrein u. Dinischiotu: Z. f. Kreisl.forsch. **1940**, 9. — Hochrein u. Schneyer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **187**, 265. — Janssen: Die Pharmakologie d. blutdruckherabs. Stoffe. Freiburg: Waibel 1934. — Kienle u. Malamani: Klin. Wschr. **1939**, 121. — Kroetz: Med. Welt. **1938**, 21. — Kutschera-Aichbergen: Klin. Wschr. **1939**, 1436. — Lichtheim: Die Störungen d. Lungenkreislaufs u. ihr Einfluß auf d. Blutdruck. Berlin 1876; Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **10**, (1879). — Martin: Arch. klin. Chir. **155**, 577 (1929). — Meesen: Arch. Kreisl.-forsch. **6**, 117 (1940). — Rein: Z. Biol. **92**, 101. — Sauerbruch: Chirurgie der Brustorgane. Berlin: Springer 1925. — Scherf u. Schönbrunner: Klin. Wschr. **1937**, 10. — Strauss, L. H.: Z. exper. Med. **106**, 119—131 (1939). — Zwillinger: Z. exper. Med. **101**, 271 (1937).

Dr. W. Hachmeister, Rinteln a. Weser, Weserstr. 19.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 200—208 (1950).

Aus dem Pharmakologischen Institut (Komm. Leiter: Dr. F. Jung) und der Medizinischen Klinik (Direktor: Prof. E. Wollheim) der Universität Würzburg.

Zum Wirkungsmechanismus cholinergischer Stoffe. VII.

Über die Wirkungen des Eserins und des Prostigmins am isolierten Froschventrikel.

Von

Fritz Jung und Helmut Barton.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 31. Oktober 1949.)

In der vorhergehenden Mitteilung* waren Daten über die Cholinesteraseaktivität isolierter Froschherzen mitgeteilt worden; nunmehr versuchten wir diese Daten durch Vergleich der Azetylcholinempfindlichkeit normaler und eserinbehandelter Froschherzen zu ergänzen. Loewi und Navratil[1] haben in ihren klassischen Untersuchungen am Froschherzen gesehen, daß Eserin die Azetylcholinwirkung nicht immer und auch nicht sehr wesentlich vertieft, sondern lediglich stabilisiert. Das Azetylcholin sollte somit während seines Andiffundierens zum Wirkungsort nicht in erheblichem Umfang gespalten werden, sondern seine Spaltung dürfte erst im Anschluß an die Wirkung einsetzen. Das Gegenstück hierzu wäre etwa der in einer Nährlösung aufgehängte glatte oder quergestreifte Muskel, dem Azetylcholin von außen zugefügt wird. Hier muß der Wirkstoff in einer unphysiologischen Versuchsanordnung erst einen beträchtlichen Weg durch esterasehaltiges Gewebe diffundieren, ehe er wirken kann. Dadurch kommt es zu erheblichen Konzentrationsverlusten und entsprechend zu einer außerordentlichen Aktivierbarkeit des Präparates durch Esterasegifte. Unsere Versuche werden zeigen, daß für den Herzmuskel der oben gezogene Schluß aus den Loewischen Versuchen voreilig ist, denn in den üblicherweise verwandten Konzentrationen hemmt Eserin nicht nur die Cholinesterase, sondern es beeinflußt auch die Azetylcholinrezeptoren des negativ inotropen Effektes. Grundsätzlich ist diese Wirkung des Eserins bereits von Harnack und Witkowski[2] festgestellt worden; denn diese geben an, daß hohe Konzentrationen Eserin die Vaguswirkung am Froschherzen aufheben können.

Unser methodisches Vorgehen ist bereits in den früheren Mitteilungen beschrieben worden. Auf Grund der Voigtschen Ergebnisse[3] suchten wir Sensibili-

* Dieses Archiv, 207, 372 (1949).

sierungserscheinungen am Herzventrikel durch eine langdauernde Vorbehandlung mit höheren Azetylcholinkonzentrationen zu vermeiden. Solche langdauernden Vorversuche sind auch insofern von Vorteil, als in ihrem Verlauf weniger widerstandsfähige Herzen, Präparate, die zu Extrasystolen neigen usw., ausgeschieden werden. Für unsere relativ langdauernden Versuche sind nämlich nur sehr widerstandsfähige Präparate geeignet. Die Versuche wurden in den Winterhalbjahren 1947/48 und 1948/49 durchgeführt. Die im Winter 1947/48 verwandten Frösche stammnen aus demselben Fang wie die Tiere der vorhergehenden Mitteilung, ein Vergleich ist also unmittelbar möglich.

I.

Das Ergebnis zweier typischer Versuche ist in Abb. 1 als Diagramm wiedergegeben. Unter A ist ein Herz dargestellt, welches durch Eserinkonzentration von 10^{-6} g/cm³ gegenüber Acetylcholin etwas empfindlicher, durch Konzentration von 10^{-5} g/cm³ „scheinbar" nicht beeinflußt und durch höhere Konzentrationen in seinem Reaktionsvermögen gegenüber Azetylcholin gehemmt wurde. Dieses Verhalten zeigte auch das Herz, das in Abb. 2 dargestellt ist. Bei der Auswertung sind nur die Anfangswirkungen des Azetylcholins miteinander verglichen worden, da Spaltung des Wirkstoffes und andere Effekte (vgl. unten) das Bild innerhalb weniger Minuten erheblich veränderten. In Abb. 1 B ist ein Versuch wiedergegeben, bei dem die aktivierenden Konzentrationen übergangen wurden, Eserin also entweder „indifferent" blieb oder die Azetylcholinwirkung hemmte. Das in A dargestellte Verhalten war im Winter 1947/48 bei der Mehrzahl der Ventrikel nachweisbar.

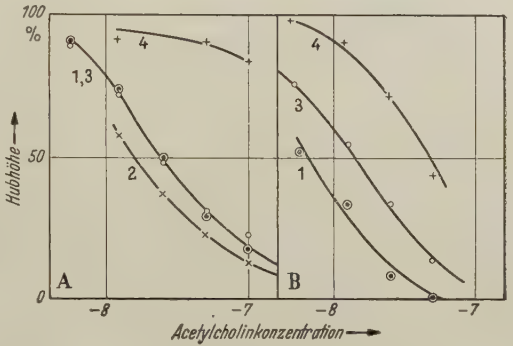


Abb. 1. Abhängigkeit der Azetylcholinwirkung von der Eserinkonzentration. Ordinate: Hubhöhe des Froschventrikels. Abszisse: Logarithmus der Azetylcholinkonzentration in g/cm³. 1) ohne Eserin. 2) 10^{-6} g/cm³ Eserin. 3) 10^{-5} g/cm³ Eserin. 4) 10^{-4} g/cm³ Eserin.

Um ein statistisch auswertbares Material zu erhalten, haben wir den Versuch mit stets gleichbleibendem Ergebnis an einer größeren Anzahl (34) von Herzen wiederholt: Unter einer Eserinkonzentration von 10^{-6} g/cm³ zeigten im 1. Jahr $^2/_3$ der Herzen eine Aktivierung, im 2. Jahr nur $^1/_6$. Eine Herabsetzung der Azetylcholinwirkung durch diese geringe Eserinkonzentration wurde im 1. Jahr niemals eindeutig, im 2. nur vereinzelt beobachtet. Unter 10^{-5} g/cm³ wurde im 1. Jahr ein einziges Mal eine Sensibilisierung festgestellt, meist entsprach die Hubhöhe dem Ergebnis bei den Versuchen in Eserinabwesenheit, gelegentlich traten auch Hemmungen der Azetylcholinwirkung auf. Höhere Eserinkonzentrationen (10^{-4} g/cm³) hemmen die Azetylcholinwirkung immer sehr stark. Gelegentlich mußte zur Erzielung der Ausgangswirkung des Azetylcholins in Eserin-freier Nährlösung nach

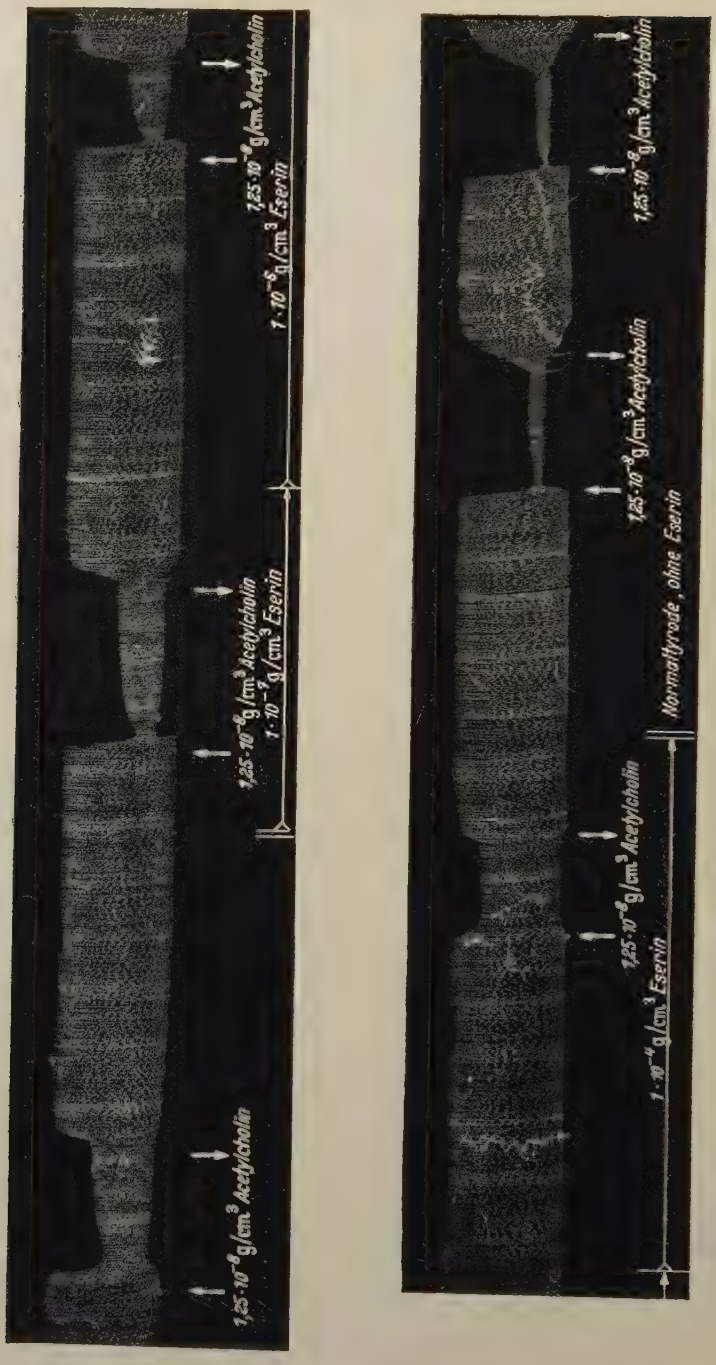


Abb. 2. Froschventrikel. Hemmung und Sensibilisierung der Azetylcholinwirkung durch Eserin.

Zugabe des Eserins die Azetylcholinkonzentration um mehr als eine Größenordnung vermehrt werden. Häufig war die negative inotrope Wirkung vollständig aufgehoben. — Eine Zusammenfassung der Versuchsergebnisse (insgesamt 57 Testungen mit 10^{-4} g/cm³ Eserin an 34 verschiedenen Herzen gegenüber anderen Eserinkonzentrationen und Eserin-freier Nährlösung) unter Errechnung von Mittelwerten kann nicht einwandfrei durchgeführt werden, da im Einzelergebnis 2 Effekte verschiedener Richtung enthalten sind. Es kommt hinzu, daß die in % festgestellten Hubhöhen sich auch aus anderen Gründen nicht einfach auf ein bestimmtes Gleichgewicht am Zellrezeptor beziehen lassen. In den Versuchen, in denen eine Sensibilisierung beobachtet wurde, führte diese durchschnittlich zu einer Herabsetzung der Herzleistung (Hubhöhe) um etwa 17%.

II.

In den Abb. 2—4 werden einige Originalkurven wiedergegeben, die belegen sollen, wie kompliziert die beobachteten Hemmungs- und Aktivierungserscheinungen sind. Sie sollen ferner belegen, daß unsere Versuchspräparate nach oft wiederholten Testungen keine Schädigung

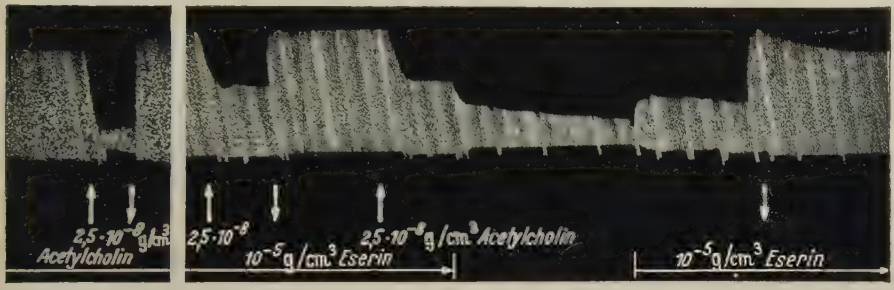


Abb. 3. Froschventrikel. Reversibilität der Hemmung der Azetylcholinwirkung durch Eserin (erster Kurventeil ohne Eserin).

zeigen und somit alle von uns beobachteten Erscheinungen reversibel sind. Im einzelnen ergibt sich:

1. Wenn auch in Eserinanwesenheit (infolge der Hemmung der Azetylcholinwirkung) meist keine besonderen Sensibilisierungserscheinungen nachweisbar sind, können solche nach Entfernung des Eserins (10^{-4} g/cm³) eindeutig auftreten (Abb. 2). Einige Minuten, nachdem die Eserinlösung entfernt ist, sind sie am deutlichsten; mit zunehmendem Spülen des Präparates und in längerer Zeit gehen sie wieder langsam zurück.

Die Esterase des Herzmuskels macht sich also von der Eserinhemmung nur langsam wieder frei. Das ist nicht überraschend, da bekannt ist, daß die Reaktionen zwischen Eserin und Esterasen relativ langsam verlaufen.

2. Mit Wegnahme des Eserins hört die Hemmung der Azetylcholinwirkung fast augenblicklich auf, die alte Empfindlichkeit auf Azetyl-

cholin (bzw. die infolge Sensibilisierung gesteigerte Empfindlichkeit) wird allerdings erst nach mehrmaligem Waschen wieder erreicht. Bei Wiederzugabe des Eserins ist die Hemmung sofort wieder vorhanden (Abb. 3).

3. Bei Prüfung höherer Azetylcholinkonzentrationen in Anwesenheit von Eserin fällt auf, daß sich der hemmende Effekt des Eserins bei längerer Anwesenheit des Azetylcholins verringert. In dem abgebildeten Versuch (Abb. 4) ist dies besonders deutlich. Es ist anzunehmen, daß unmittelbar nach Zugabe des Azetylcholins an den Rezeptoren noch Eserin sitzt und sich dann das definitive Gleichgewicht erst sehr langsam einstellt.

Bekanntlich sieht die Azetylcholinwirkung unter Eserin völlig anders aus als bei wirksamer Esterase. Ihr zeitlicher Verlauf ist aber auch von

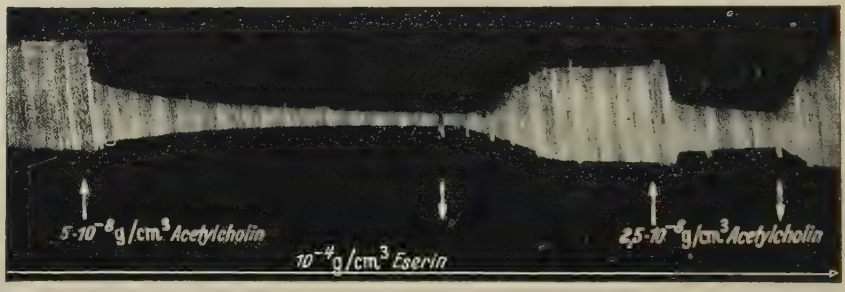


Abb. 4. Froschventrikel. Langsame Verminderung der Hemmung bei längerdauernder Azetylcholinanwesenheit.

dem der Carbaminoylcholinwirkung verschieden, welche sich — namentlich in den ersten Minuten — nach der Zugabe erheblich vermindern kann, ohne daß dafür ein Carbaminoylcholinverlust verantwortlich gemacht werden könnte. Man muß also annehmen, daß der Verlauf der Azetylcholinwirkung in Eserinanwesenheit nicht allein durch die Esterasehemmung bestimmt wird, sondern auch durch die langsame Einstellung des definitiven Gleichgewichtes zwischen Eserin und Azetylcholin zugunsten des Wirksamwerdens von weiterem Azetylcholin.

III.

Wesentlich übersichtlichere Verhältnisse als bei Azetylcholin ergaben sich bei Carbaminoylcholin. Hier ist grundsätzlich eine Sensibilisierung durch Esterasehemmung ausgeschlossen und daher der Hemmungseffekt rein darzustellen. In der folgenden kleinen Tabelle ist ein Teil unserer Versuche zusammengefaßt. Von zahllosen Versuchen an jedem der 10 Herzen sind nur diejenigen herausgegriffen, in welchen Doryl (Carbaminoylcholin) in einer günstigen Konzentration (erreichte Wirkung

zwischen 30 und 70% Hubhöhenabnahme) angewandt wurde und in welchen Eserin in der eindeutig wirksamen Konzentration von 10^{-4} g/cm³ geprüft wurde. Bei geringeren Eserinkonzentrationen waren die Ergebnisse teilweise negativ.

Carbaminoylcholin-konzentration	restliche Hubhöhe des Ventrikels in %	
	ohne Eserin	mit Eserin
1. 2,5 10^{-8}	40	70
2. ebenso	55	82
3. ebenso	61	89
4. ebenso	65	91
5. 5,0 10^{-8}	30	84
6. ebenso	45	89
7. ebenso	50	80
8. 5,0 10^{-7}	55	89
9. ebenso	61	74
10. 5,0 10^{-8}	50	85 (Prostigmin-versuch).

Die Tabelle zeigt, daß die Hemmung der Carbaminoylcholinwirkung bei den weniger Carbaminoylcholin-empfindlichen Herzen 8 und 9 etwa genau so groß ist wie bei den hochempfindlichen Präparaten 1—4. Auch der Prostigmineinfluß bewegt sich in denselben Grenzen. Man kann daher sämtliche Werte in einen Mittelwert zusammenfassen, wobei man für das unbeeinflußte Herz eine Hubhöhe von etwa 50% und für das eserinisierte von 85% erhält.

Bei jedem Herzen wurde im Anschluß an die Versuche mit der Eserinkonzentration von 10^{-4} g/cm³, die Wirkung des Carbaminoylcholins in eserinfreier Nährlösung ein zweites Mal getestet. Dabei ergab sich bei vier Fünftel aller Versuche eine etwas stärkere Wirkung wie vor der Eserinbehandlung (Sensibilisierung ?).

In einigen Versuchen wurde in ein (unter normaler Nährlösung schlagendes) Herz ein Gemisch aus Eserin 10^{-4} g/cm³ und Carbaminoylcholin gegeben. Unter diesen Bedingungen setzte die Carbaminoylcholinwirkung zunächst stark ein, nahm dann allmählich ab. Wurde umgekehrt Carbaminoylcholin auf ein Herz gegeben, welches bereits längere Zeit unter der Einwirkung einer höheren Eserinkonzentration stand, so war die anfängliche Carbaminoylcholinwirkung sehr gering (vgl. oben), nahm aber im Laufe des Versuches häufig — nicht immer — wieder etwas zu. Genau so wie bei den Versuchen mit Azetylcholin dürfte sich somit das endgültige Hemmungsgleichgewicht des Eserins gegen Carbaminoylcholin ziemlich langsam ausbilden.

Schließlich wurde in einigen weiteren Versuchen auch Prostigmin gegenüber Azetylcholin und Carbaminoylcholin geprüft. Wie der oben in der Tabelle mit angeführte Versuch, aber auch die weiteren Ergebnisse zeigen, unterscheidet sich das Prostigmin nicht vom Eserin. Allerdings

wurden bei höheren Prostigmindosen im Gegensatz zum Eserin häufig dem Prostigmin zukommende negativ inotrope Effekte festgestellt.

Besprechung.

Eserin und Prostigmin hemmen die negativ inotrope Wirkung des Azetylcholins und Carbaminoylcholins am Froschherzen. Eine genaue quantitative Überprüfung des Hemmungseffektes ist wegen der Esterasewirksamkeit nur beim Carbaminoylcholin möglich. Eserinkonzentrationen von 10^{-4} g/cm³ in der Nährlösung drücken die negativ inotrope Wirkung des Carbaminoylcholins von ca. 50% Hubminderung auf 100—85 = 15% Hubminderung herab. Diese Wirkungsdifferenz läßt sich auf Grund der von Clark ermittelten Dosiswirkungskurve für Azetylcholin (bzw. auch für Carbaminoylcholin) in eine Konzentrationsdifferenz umrechnen. Sie entspricht etwa einer Herabsetzung der Carbaminoylcholinkonzentration auf ein Zehntel. Ein von Gaddum[5] aufgestellter mathematischer Apparat erlaubt die Erfassung solcher Hemmungsgleichgewichte: Für den Fall der Hemmung von Azetylcholin (Az) durch Atropin (At) und bei Beschränkung auf 50%ige Dämpfung des Froschherzens durch Az ergibt sich eine einfache Formel: $K_1\,(Az) = 1 + K_2\,(At)$. Die eingeklammerten Werte sind molare Konzentrationen. K_1 ist eine für die Bindung des Azetylcholins charakteristische Konstante vom Wert 10^6 und K_2 eine für die Atropin-Azetylcholinbeziehung charakteristische Verdrängungskonstante vom Wert 3.10^7 (beide Konstanten jeweils in der Einheit „je molare Konz."). Die Formel gibt z. B. bei Auswertung in Atropinabwesenheit, daß eine 10^{-6} molare Azetylcholinlösung das Froschherz um 50% dämpft und bei Auswertung in Anwesenheit von 10^{-6} molar Atropin zu derselben Dämpfung die 30fache Azetylcholinmenge notwendig ist ($1 + K_2\,(At) = 1 + 3 \,.\, 10^7 \,.\, 10^{-6} \approx 30$). — Wir können sie auch auf unser Hemmungsgleichgewicht anwenden, sogar ohne zu wissen, wie groß K_1 für Carbaminoylcholin ist: Es genügt die Angabe, daß Zugabe von 10^{-4} g/cm³ Eserin eine Minderung der Carbaminoylcholinwirkung entsprechend einer Konzentrationssenkung auf ein Zehntel herbeiführt. Es muß daher $1 + K_2\,(Eserin) = 1 + K_2\,(10^{-4}\ g/cm^3) = 10$ sein. Hieraus folgt $K_2 \approx 10^5$ cm³/g Eserin. Wird die Verdrängungskonstante K_2 für Atropin auch in die Konzentrationseinheit g/cm³ umgerechnet, so ergibt sich ca. 10^8 cm³/g Atropin. Eserin hemmt somit die Carbaminoylwirkung etwa 1000mal weniger als Atropin die Azetylcholinwirkung. Eine einfache Umrechnung zeigt, daß Eserinkonzentrationen um 10^{-5} g/cm³ die Carbaminoylcholinwirkung etwa auf die Hälfte herabdrücken dürften, während Konzentrationen um 10^{-6} g/cm³ keine meßbaren Hemmungswirkungen besitzen.

Das Hemmungsgleichgewicht in den Versuchen mit Azetylcholin läßt sich etwa abschätzen. Aus Abb. 1—4 geht hervor, daß es mindestens

ebenso groß sein muß wie beim Carbaminoylcholin. Wie bei diesem müssen aber auch hier alle Berechnungen mit einer gewissen Vorsicht aufgenommen werden, da die definitive Einstellung der ganzen Gleichgewichte bei beiden Verbindungen nicht absolut sicher ist.

Unsere ursprüngliche Absicht, „die Bestimmung der Esteraseaktivität", stößt infolge der Hemmungserscheinungen auf fast unüberwindliche Schwierigkeiten. Aus Abb. 2 ist zu entnehmen, daß die stärkste Sensibilisierung der Azetylcholinwirkung erst im Anschluß an die Anwendung sehr hoher Eserinkonzentrationen erreicht wurde. Es erscheint uns daher fraglich, ob mit den üblicherweise angewandten Konzentrationen von 5×10^{-6} g/cm³ (LENDLE[5]) oder 10^{-5} g/cm³ (LOEWI und NAVRATIL[1]) wirklich die gesamte Esterase *vollständig* ausgeschaltet wird. Wahrscheinlich geben diese Eserinkonzentrationen das Optimum des äußeren Sensibilisierungseffektes, indem bei ihnen einerseits bereits ein erheblicher Teil der Esterase ausfällt, andererseits die Hemmungswirkung noch kaum ausgebildet ist. (Die von uns analysierten Effekte sind aus den Kurven von LENDLE[5] teilweise auch abzulesen, z. B. beobachtet auch er die Wirkungszunahme des Azetylcholins bei Eserinanwesenheit.) Immerhin zeigt Abb. 2, daß sich das Eserin von den „Rezeptoren der negativ inotropen Wirkung" (Hemmung der Azetylcholinwirkung) erheblich schneller loslöst als von der Cholinesterase. Im Anschluß an die Behandlung eines Herzens mit einer hohen Eserinkonzentration dürfte man daher dem wahren Sensibilisierungseffekt nahekommen. Für dessen Ermittlung ist aber wahrscheinlich die Anwendung von anders wirkenden Esterasegiften geeigneter.

Für den in Abb. 2 wiedergegebenen Versuch läßt sich eine Auswertung durchführen. Die zwischen 1. und 4. Testung aufgetretene Sensibilisierung entspricht einer Zunahme der Azetylcholinkonzentration auf mindestens das 10fache, was bedeuten würde, daß bei der ersten Testung infolge der Esterasewirkung nur $^1/_{10}$ des Azetylcholins an den Wirkungsort gelangt. Aus der Schnelligkeit des Wirkungseintrittes einer zugegebenen Azetylcholinmenge läßt sich ferner annähernd entnehmen, wie lange das Azetylcholin nach Einfüllen ins Herz zur Andiffusion an den Wirkungsort braucht. Es sind dies in der 1. wie in den beiden letzten Testungen etwa 7—10 Kontraktionen. Im Verzug dieser Andiffusion schwindet aber 90% des Azetylcholins. Der Schwund je Kontraktion dürfte also $^1/_4$ oder 25% sein, falls 8 Kontraktionen gerechnet werden; $(^3/_4)^8 \approx {}^1/_{10}$.

In der vorhergehenden Mitteilung war festgestellt worden, daß pro Kontraktion im Durchschnitt etwa 1% des im Herzinnern befindlichen Azetylcholins zerstört wird. Die Differenz beider Ergebnisse weist darauf hin, daß die Esterase nicht auf die Masse des im Herzinnern befindlichen Azetylcholins wirkt, sondern daß sie sich am Andiffusionsweg des Azetylcholins zum Wirkungsort konzentrieren muß. Diese Konzentration muß ganz erheblich sein, da die von uns durchgeführte Berechnung im wesentlichen nur Fehler im Sinne einer zu geringen Wirksamkeit enthalten kann. Dieses Ergebnis entspricht etwa den Befunden von NACHMANNSOHN[8] am quergestreiften Muskel, bei dem auch Wirkungsort und Spaltungsort des Azetylcholins unmittelbar benachbart sind.

Rothberger und Winterberg[7] wie später Zinnitz[6] haben ebenfalls Hemmungen der Azetylcholinwirkung durch Eserin an verschiedenen Organen festgestellt. Es ist auf Grund unserer Befunde und Versuchsanordnungen nicht notwendig, diesen Hemmungseffekt mit Rothberger und Winterberg[7] auf Sekundärerscheinungen (insonderheit Schlagfolgestörungen) zurückzuführen. Ebenso scheint uns die von Zinnitz[1] versuchte Deutung mit Hilfe des Potentialprinzipes durch unsere Versuche mit Carbaminoylcholin gegenstandslos geworden zu sein. Zinnitz[6] versucht nämlich, die Hemmung auf die Ausschaltung der Azetylcholinspaltung im Zellinneren und die dadurch bewirkte Aufhebung des Azetylcholinpotentiales zurückzuführen. Da sich unsere Befunde ziemlich zwanglos auf Grund einer Verdrängungshemmung („competitive Inhibition") deuten lassen, soll auf ihre Diskussion mit Hilfe der Potentialtheorie als heuristischem Prinzip verzichtet werden, sie ließe sich auch ohne eine gewisse Vergewaltigung kaum durchführen. — Ungeklärt muß die von uns beobachtete geringfügige Sensibilisierung der Carbaminoylcholinwirkung bleiben.

Zusammenfassung.

1. Die negativ inotrope Wirkung des Azetyl- und Carbaminoylcholins am isolierten Froschherzen wird durch höhere Dosen Eserin und Prostigmin gehemmt.

2. Die hemmende Wirkung des Eserins dürfte etwa 1000mal geringer sein, wie die des Atropins.

3. Sämtliche Hemmungsgleichgewichte stellen sich relativ langsam ein, jedoch immer noch schneller als das Gleichgewicht zwischen Eserin und Cholinesterase des Froschherzens.

4. Es ist zu vermuten, daß sich am Froschherzen die Esterase am Angriffspunkt des Azetylcholins konzentriert.

Literatur.

[1] Loewi, O., u. E. Navratil: Pflügers Arch. **214**, 689 (1926). — [2] Harnack, E., u. L. Witkowski: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **5**, 401 (1876). — [3] Voigt, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **203**, 282 (1944). — [4] Clark, A. J.: „General Pharmacology" in Handb. exp. Pharmakologie, Ergänzungsband IV. S. 66 u. 185 Berlin: Springer 1937. — [5] Lendle, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **197**, 519 (1941). — [6] Zinnitz, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **182**, 240 (1936). — [7] Rothberger, C. J., u. H. Winterberg: Pflügers Arch. **132**, 233 (1910). — [5] Murnay u. Nachmannsohn: J. Physiol. **92**, 37 (1938).

Fritz Jung, Berlin, Pharmakol. Institut der Humboldt-Universität.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 209—213 (1950).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg/Br.
(Direktor: Prof. Dr. L. Heilmeyer).

Über die fermentative Oxydation von Adrenalin im menschlichen Serum.

Von
Joachim Pirwitz und G. Scherer.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 9. November 1949.)

Die Kenntnis von der Funktion des Adrenalins im menschlichen Körper wird durch die Vielfalt seiner Angriffspunkte erschwert, da neben der Wirkung auf das vegetative Nervensystem zweifellos auch bestimmte Wirkungen auf die Zelle unmittelbar bestehen. Vor allem verfügen wir noch über keine klare Vorstellung des Abbaumechanismus. Sie ist um so mehr anzustreben, als eine Reihe von Beobachtungen dafür spricht, daß den verschiedenen Abbaustufen bestimmte physiologische Bedeutung zukommt. Es scheint also wichtig zu untersuchen, mit welchem Mittel und mit welcher Geschwindigkeit bei normalen und pathologischen Zuständen der Körper Adrenalin abbaut und ob Schwankungen der Abbaugeschwindigkeit physiologisch deutbar sind.

Nach unserer heutigen Kenntnis scheinen 2 Abbauwege gesichert: 1) die oxydative Desaminierung mit Hilfe eines kupferhaltigen Fermentes (Brenzkatechinase, Tyraminase, Polyphenoloxydase, Adrenalinoxydase). Die Beobachtung Kischs[1] jedoch zeigt, daß 2) Oxydationsstufen des Adrenalins die Rolle des Sauerstoffüberträgers zukommen kann. Hier ist der chemische Weg des Abbaus über das Chinon wahrscheinlich. Es sind jedoch noch eine Reihe anderer Abbaumöglichkeiten chemisch denkbar, die Marquardt[2] ausführlich geschildert hat. Über die Funktion der Abbauprodukte ist bisher wenig bekannt. Lettré[3] hat nachgewiesen, daß das Adrenochrom als einzige bisher bekannte körpereigene Substanz mitosehemmende Wirkung hat, also offenbar die Teilungsgeschwindigkeit von Zellen regulieren kann. Danach ist wahrscheinlich, daß das Adrenalin und seine Abbauprodukte in Gleichgewichtsreaktionen gleichzeitig die Durchblutung von Geweben, ihre Sauerstoffversorgung und ihre Teilungsgeschwindigkeit regulieren können.

Ziel unserer Versuche war zu messen, auf welche Weise und mit welcher Geschwindigkeit das Adrenalin zu seinen Chinonabkömmlingen oxydiert wird. Wir wählten als Ausgangsmaterial menschliches Serum, da es chemischen Untersuchungen leichter zugänglich ist als Gewebe.

Um den Anteil des durch katalytische Wirkung des oxydierten Adrenalins verbrauchten O_2 möglichst gering zu halten, setzten wir 0,6 cm³ Serum mit 1,4 cm³ einer handelsüblichen 1%igen Adrenalinlösung im WARBURG-Apparat an und maßen den Sauerstoffverbrauch dieses Gemisches in Abständen von 10 min 2 Std lang bei 37°. Da sich der Sauerstoffverbrauch während der Versuchszeit allmählich verringert, also in der 2. Stunde geringer als in der 1. ist, drückten wir die gemessenen Resultate nach der Formel $\frac{a + \frac{b}{2}}{2}$ aus, wobei a der Wert der 1. Stunde in mm³, b der Wert der 2. Stunde ist. Die Zeitdauer von der Blutabnahme bis zu Beginn der Messung betrug niemals mehr als 60 min. Der Sauerstoffverbrauch normalen Serums nach obiger Formel ausgedrückt betrug 22 mm³ pro cm³. Der Sauerstoffverbrauch des Adrenalin-Serumgemisches umgerechnet auf 1 cm³ Serum 73 mm³. Es fand also eine beträchtliche Steigerung statt.

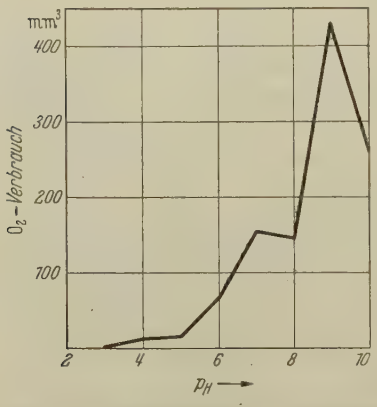


Abb. 1. p_H Abhängigkeit des O_2-Verbrauches von Serum und Adrenalin.

Da die normale Adrenalinlösung sich erst in einigen Tagen bei Zutritt von Luftsauerstoff bräunlich färbt, mußte eine beschleunigende Wirkung der Oxydation durch Serum zustande kommen. Wir fragten uns nun, mit welchen Mitteln das geschieht. Da GREEN und RICHTER[4] die Oxydation von Adrenalin durch Brom und Jod beschrieben haben und eine Reihe anderer Substanzen, die im Serum vorhanden sind, die gleiche Wirkung haben könnten, dialysierten wir 20 cm³ Serum im Zellophanschlauch gegen 500 cm³ metallfreien destillierten Wassers 24 Std lang, dampften im Vakuum bei 37° auf die im Serum enthaltene Ausgangsmenge ein und setzten das konzentrierte Dialysat mit der Adrenalinlösung zusammen an. Es fand unter den beschriebenen Bedingungen während 2 Std keine Oxydation statt. Auch der Rückstand im Dialysierschlauch oxydierte nicht meßbar. Mischte man dagegen eingedampftes Dialysat und Rückstand, so erreichte die Oxydation die ursprüngliche Geschwindigkeit. Wir schlossen daraus, daß die Oxydation durch ein System mit einem dialysablen und einem nicht dialysablen Anteil bewirkt wird.

Wir maßen nun, bei welchem p_H das Wirkungsoptimum dieses Systems läge und pufferten bei einem p_H von 4 und 5 mit Natriumazetat + Essigsäure, p_H 6 bis 8 mit primärem und sekundärem Phosphat, p_H 9 bis 10 mit Ammonchlorid + NH_3. Dabei fand sich ein deutliches Wirkungsoptimum

bei einem p_H von 9. Die Einzelwerte sind aus der beigefügten Abb. 1 ersichtlich.

Um zu erproben, ob ein Metallgehalt des Fermentes wahrscheinlich ist, setzten wir zunächst Blausäure bis zu Konzentrationen von 1/100 n hinzu. Es erfolgte keine deutliche Veränderung. 8-Oxychinolin bewirkte eine Verringerung, Trilon A beeinflußte den Sauerstoffverbrauch kaum. Wir schlossen daraus, daß das Ferment gar kein Schwermetall oder dieses nur in sehr fester Bindung enthält. Es wurde eine Reihe anderer Substanzen auf ihre Beeinflussung des Systems erprobt. Die erhaltenen Werte werden aus der beigefügten Abb. 2 ersichtlich.

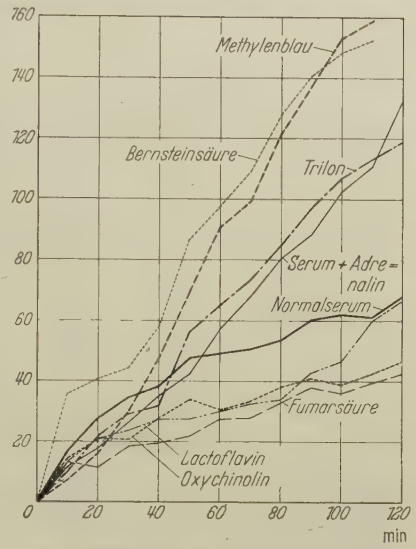


Abb. 2. Einfluß verschiedener Zusätze auf den O_2-Verbrauch von Serum und Adrenalin.

Es interessierte nun, ob bestimmte Oxydationsgeschwindigkeiten des Adrenalins durch Serum für bestimmte Krankheiten pathognomonisch seien. Wir untersuchten deshalb Serum von Krankheitsgruppen: hoch fieberhafte akute Erkrankungen, renaler Hochdruck, essentieller Hochdruck, schwer kachektische Karzinome, myeloische Leukämien, in Doppelbestimmung. Die Fälle zeigten eindeutige und ausgeprägte klinische Befunde, so daß über den differentialdiagnostischen Wert der Messungen nichts ausgesagt werden kann. Untersuchungen darüber sind im Gange. Die gemessenen Werte in mm^3 O_2 gibt Tab. 1 wieder.

Aus ihr geht hervor, daß bei hoch fieberhaften Erkrankungen die Fähigkeit des Serums, Adrenalin zu oxydieren etwas herabgesetzt ist. Dagegen ist sie bei essentiellem Hochdruck und beim Karzinom mit Kachexie sehr erheblich und regelmäßig gesteigert. Diese Regelmäßigkeit ist so groß, daß es zu untersuchen lohnt, ob wir auf diese Weise ein verläßliches Differentialdiagnostikum zwischen renalem und essentiellem Hochdruck erhalten können. Weiter wird aus den Ergebnissen klar, daß die bei myeloischen Leukämien erheblich stärker als bei Karzinomen ausgeprägte Grundumsatzsteigerung und Neigung zu Temperaturen nicht auf die Steigerung des Stoffwechsels durch Oxydationsprodukte des Adrenalins zurückzuführen ist. Dagegen scheint die Steigerung der Wirksamkeit des Fermentes bei der essentiellen Hypertonie ein regulativer Effekt zu sein.

Wir untersuchten weiter, ob nur das Serum oder auch die anderen Bestandteile des Blutes zur Adrenalinoxydation imstande seien und fanden dabei, daß 3mal gewaschene Erythrozyten in der Regel nicht imstande waren zu oxydieren, daß in Einzelfällen geringfügige Oxydationen zustande kamen, gelegentlich auch bei Patienten, deren Erythrozyten in früheren Versuchen nicht oxydiert hatten. Man hatte den Eindruck, daß bei leichten Infekten auch die Erythrozyten eine geringe oxydative Fähigkeit hatten. Dagegen war diese Fähigkeit sehr ausgesprochen in der obersten leukozytenreichen Schicht der abzentrifugierten Zellbestandteile des Blutes.

Tabelle 1.

Nr.	Normalserum	Hoch fieberhafte Erkrankungen	Renaler Hochdruck	Essentieller Hochdruck	Karzinom	Myeloische Leukämie
1	61	40	53	129	132	55
2	52	34	48	115	111	50
3	57	38	49	126	121	62
4	53	26	53	134	140	59
5	54	39	46	138	132	60
6	50	33	54	130	126	55
7	53	32	51	125	124	56
8	40	36	50	132	125	36
9	40	—	—	129	—	—
10	57	—	—	—	—	—
Mittelwerte . .	58	35	51	129	127	57
% der Norm .	100	67	98	249	245	110

Wir fragten uns weiter, ob auch andere Gewebe des Organismus imstande seien Adrenalin zu oxydieren und setzten Leber, Milz, Muskel, Herzmuskel, Niere, Lunge und Darm von Mäusen an. Wir fanden dabei niemals eine Steigerung durch in den angegebenen Mengen zugesetztes Adrenalin. Dagegen wurde die Atmung von Darm- und Nierengewebe regelmäßig und deutlich gehemmt. Wenn man diese an Mäusegeweben gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen übertragen darf, so ist der Schluß erlaubt, daß die Gesamtoxydation des Adrenalins innerhalb des Gefäßsystems unter bevorzugter Beteiligung von Serum und Leukozyten vonstatten geht.

Zusammenfassung.

1. Adrenalin wird durch menschliches Serum zum Chinon oxydiert.

2. Die Oxydation kommt mit hoher Wahrscheinlichkeit durch ein Ferment zustande, das einen dialysablen und einen nicht dialysablen Anteil hat und dessen Wirkungsoptimum bei einem p_H von 9 liegt.

3. Zugesetzte starke Komplexbildner bewirkten keinen klaren Hemmeffekt, so daß eine Schwermetallkomponente unwahrscheinlich wird.

4. Bei den untersuchten Kranken mit essentiellen Hypertonien und schweren Karzinomen ist die Fähigkeit des Serums, Adrenalin zu oxydieren stark und regelmäßig gesteigert. Die gemessenen Werte liegen weit außerhalb der bei anderen Kranken gefundenen Zahlen. Da bisher nur Kranke mit ausgeprägtem Krankheitsbild untersucht wurden, kann über den differentialdiagnostischen Wert der Probe noch nichts ausgesagt werden.

Literatur.

[1] Kisch: Hdbch. Biochem., Erg-WK I A S. 563, Jena 1933. — [2] Marquardt, P.: Chemische und Pharmakologische Probleme der Adrenalinoxydation (noch unveröffentlicht). — [3] Lettré, H.: Die Naturwissensch. **33**, 75 (1946). — [4] Green, D. E., u. Richter: Biochem. J. (Brit.) **31**, 2187 (1937).

Dr. J. Pirwitz, Freiburg/Br., Med. Univ.-Klinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 214—218 (1950).

Aus dem Physiologischen und Pathophysiologischen Institut der Universität Debrecen
(Direktoren: Prof. Dr. S. Went und Dr. L. Kesztyüs).

Phosphorylierung im denervierten Muskel.

Von
E. Varga, K. Kostya, É. Szabó, L. Aszódi und L. Kesztyüs.

(Eingegangen am 30. November 1949.)

In der Literatur findet man nur wenige Daten über die veränderten Enzymtätigkeiten des denervierten Muskels. Diese Versuche beschäftigen sich in erster Reihe mit dem Verhalten des Azetylcholin-Cholinesterase-Systems. Über die Frage, wie die Phosphorylierungsprozesse im Muskel durch Denervierung beeinflußt werden, sind nur sehr spärliche Angaben vorhanden.

Kometiani[1] beobachtete, daß die Phosphorylierungsprozesse im innervierten Mittelstück des M. sartorius um 30—50% intensiver verlaufen, als in den nicht innervierten Randteilen des Muskels. Die Phosphorylierung im Katzengastrocnemius nach Durchschneiden des N. ischiadicus und der Achilles-Sehne wurde von Vesselkin und Vesselkina[2] untersucht. Es ergab sich auch hier eine Abnahme der Phosphorylierungsgeschwindigkeit. Diese Abnahme wird — nach Meinung der Verfasser — durch Ausschaltung eines Regulationsmechanismus verursacht, der unter physiologischen Umständen über die motorischen oder sympathischen Nervenfasern regulatorisch auf das bei der Phosphorylierung fungierende Fermentsystem einwirkt.

Da wir in der zugänglichen Literatur keine andere Angaben fanden und die von Vesselkin und Vesselkina angewandte, aus dem Jahre 1927 stammende Embden-Habs-Methodik ziemlich veraltet und nicht ganz einwandfrei ist, versuchten wir, mit der neuen Methodik von Lohmann-Schumann-Verzár[3] die Frage zu entscheiden, wie die Phosphorylierungsprozesse durch die Denervierung des Muskels beeinflußt werden.

Die Versuche wurden an gesunden Katzen von 2—3 kg Gewicht durchgeführt. Der rechte N.ischiadicus wurde in Äthernarkose und unter strenger Asepsis durchschnitten. Nach der Operation wurden die Tiere mit konstanter Diät aus Fleisch und Milch gefüttert. Am 7.—20. Tage nach der Ischiadicusdurchschneidung wurden sie aus der Karotis entblutet und sowohl der linksseitige normale, wie auch der rechte denervierte M. gastrocnemius möglichst schnell herauspräpariert, mit Kohlensäureschnee gefroren und mit Latapiemühlen zermahlen. Danach haben wir mit Glykogen enthaltender NaF- + $NaHCO_3$-Pufferlösung 20%ige Muskelbreie hergestellt. Sofort und nach 60 min lang dauerndem Stehenlassen auf Zimmertemperatur wurde der freie anorganische PO_4-Gehalt der Breie photometrisch nach der Methode von Lohmann-Jendrassik[4] bestimmt.

Die prozentuale Abnahme des anorganischen Phosphats in 1 Std konnte als Indikator der Phosphorylierung des Glykogens betrachtet werden, weil durch das NaF das Wiederfreiwerden des Phosphats aus seiner organischen Bindung in der Triosephosphorsäurephase verhindert wird. In allen Versuchen wurde auf die ausschließliche Verarbeitung des M. gastrocnemius geachtet, denn die Phosphorylierungsprozesse verlaufen — nach unseren vorherigen Erfahrungen — in verschiedenen Muskeln mit verschiedener Intensität. Tabelle 1 zeigt einen Teil unserer Versuchsresultate.

Tabelle 1.

Tier Nr.	Tage nach Denervierung	% Abnahme des anorganischen Phosphats in 1 Stunde	
		in normalen Muskeln	in denervierten Muskeln
6	7	56	53
47	8	55	57
59	10	54	49
61	10	61	35
52	12	61	33
53	14	48	12
63	14	46	17
62	16	61	15
79	18	75	18
81	19	73	13

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, stimmt das Phosphorylierungsvermögen des denervierten Muskels bis zum 7. bis 8. Tage nach der Denervierung mit dem des gegenseitigen normalen Kontrollgastrocnemius innerhalb der Fehlergrenzen überein. Wurde der Zeitabschnitt zwischen dem Durchschneiden des Nerven und dem Hauptversuch länger, so fanden wir immer größere Differenzen in der Phosphorylierungsgeschwindigkeit der normalen und denervierten Muskeln. Die am normalen Kontrollgastrocnemius durchgeführten Versuche ergaben in 1 Std 46—73%ige Phosphatabnahme; demgegenüber erniedrigten sich diese Werte im denervierten M. gastrocnemius um 12—49%. Wurden die Phosphatbestimmungen noch später, etwa in der 4. Woche nach der Ischiadicusdenervation durchgeführt, so konnten wir mit unserer Methode eine Abnahme des anorganischen Phosphats im denervierten Gastrocnemiusbrei nicht mehr nachweisen, ein Zeichen, daß unter diesen Umständen eine Phosphorylierung im denervierten Muskel nicht mehr abläuft.

Nachdem es aus Untersuchungen von Verzár und Mitarbeitern bekannt geworden ist, daß bei adrenalektomierten Tieren die verminderte Muskel-Phosphorylierung durch Desoxycorticosteron sowohl in vivo wie auch in vitro regelmäßig restitutiert werden kann, schien es

interessant zu versuchen, wie diese Substanz die durch Denervierung herabgesunkene Phosphorylierung beeinflußt. Diese Frage hat zunächst eine theoretische Bedeutung: In der Literatur wird nämlich die Meinung geäußert, daß durch Desoxycorticosteron *alle* Phosphorylierungsprozesse beeinflußt werden, weil es in diesen Prozessen als Co-Ferment oder wenigstens als Beschleunigungsfaktor wirkt. Auf Grund dieser theoretischen Annahme haben die Kliniker immer wieder versucht, in der Therapie ätiologisch ganz verschiedener Muskeladynamien und Myasthenien eine Nebennierenrindenhormonsubstitution anzuwenden. Die therapeutischen Erfolge waren allerdings sehr wechselvoll. Diese unbegründete Verallgemeinerung führte vielfach zu einseitigen Auffassungen; so kam z. B. Maes[5] sogar zu dem unwahrscheinlichen Resultat, daß die Myasthenie adrenalektomierter Tiere durch die auf Cortinmangel zurückführbare, reflektorische Ermüdbarkeit des Zentralnervensystems erklärbar sei. Diese Auffassung steht in Gegensatz zu den Ergebnissen aller Versuche über periphere Muskelreizung.

Um der oben erwähnten Frage näherzukommen, haben wir bei 12 Katzen die Durchschneidung des rechten N. ischiadicus in Äthernarkose und unter sterilen Kautelen durchgeführt; nach Tötung der Tiere am 16. bis 22. Tage wurde die Phosphorylierung sowohl des linksseitigen normalen, wie auch des rechten denervierten M. gastrocnemius mit der oben geschilderten Methode bestimmt. Zu dem Breie des rechten denervierten M. gastrocnemius gaben wir Desoxycorticosteron in 0,001—1%iger Konzentration und die in Anwesenheit von Desoxycorticosteron beobachtete prozentuale Phosphatabnahme wurde mit der des (kein Cortin enthaltenden) Kontroll-Muskelbreies verglichen*. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2.

Tier Nr.	Tage nach Denervierung	% Abnahme des anorganischen Phosphats in 1 Stunde					
		normale Muskeln	denervierte Muskeln Cortin				
			0%	0,001%	0,01%	0,1%	1%
79	18	75	18	—	18	18	—
81	19	73	13	—	10	10	—
82	20	63	9	—	8	8	—
83	20	53	14	—	10	11	9
84	20	64	16		14	14	13
85	16	57	5		6	6	4
2	22	50	16	16	16		
5	18	68	27	22	22		
7	16	60	10	12	12	—	13
11	21	45	15	13			13

* Für die gütige Überlassung von Desoxycorticosteron sprechen wir der Firma „Richter" in Budapest unseren Dank aus.

Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich ist, steigert Desoxycorticosteron das herabgesetzte Phosphorylierungsvermögen des denervierten M. gastrocnemius überhaupt nicht. Die beobachteten kleineren Abweichungen liegen im Gebiet der methodischen Fehler.

Diskussion.

Der erste Teil unserer Versuchsergebnisse bestätigt die früheren Literaturangaben: Alle motorischen, trophischen und sympathischen Nervenimpulse beeinflussen und regulieren die fermentativen Phosphorylierungsprozesse des Muskels.

Vesselkina[6] hat den Glykogengehalt des Muskels nach Ausschaltung des Sympathikus bestimmt und festgestellt, daß der Muskel nach Durchschneiden des Nerven nicht mehr imstande ist, seinen Glykogengehalt zu regulieren. Sie folgerte, daß bei Störungen der fermentativen Prozesse in denervierten Muskeln der Ausfall der sympathischen Innervation die wichtigste Rolle spiele. Diese Meinung stimmt zweifellos gut mit der Vorstellung über den natürlichen Mechanismus der Cortinbildung überein (Vogt[7]). Demgemäß wird Adrenalin bei Anstrengungen und bei Muskelarbeit ausgeschüttet infolge von Reizen, welche das Nebennierenmark über den N.splanchnicus erreichen. Dies Adrenalin bewirkt einerseits die bekannten Erscheinungen der Sympathikusreizung, wobei Leberglykogen zu Traubenzucker umgewandelt wird, der in den Muskeln verbraucht wird. Gleichzeitig setzt durch die Adrenalinwirkung eine vermehrte Cortinausschüttung ein, die durch die Phosphorylationsprozesse den Glykogenaufbau fördert und damit die Restitution beschleunigt. Nach Vesselkin und Vesselkina wird dieser Restitution regulierende Mechanismus durch Durchschneiden der sympathischen Fasern, schon in der ersten Phase verhindert.

Diese zweifellos geistreiche Hypothese steht aber nicht im Einklang mit der Tatsache, daß die herabgesetzten Phosphorylierungsprozesse des denervierten Muskels durch Desoxycorticosteron in vitro nicht restituiert werden können. Es ist also kaum möglich, die abgesunkene Phosphorylierung im denervierten Muskel durch einen örtlichen Nebennierenrindenhormonmangel zu erklären.

Vom praktischen Gesichtspunkte aus dürfte die Feststellung wichtig sein, daß Desoxycorticosteron nur die spezifisch auf Nebennierenrindeninsuffizienz zurückführbare Phosphorylierungsabnahme zu restituieren imstande ist; mit anderen Worten: Die Nebennierenrindenhormonbehandlung kann nur die durch Abnahme der Cortinproduktion hervorgerufene Adynamie verbessern. Die Unwirksamkeit von Cortin bei allen ätiologisch nicht in diesen Kreis gehörenden Muskelanomalien ist also theoretisch ohne weiteres verständlich.

Zusammenfassung.

Versuche an Katzen zeigten, daß das Glykogenphosphorylierungsvermögen des denervierten M. gastrocnemius vom 9. bis 10. Tage nach der Nervendurchschneidung fortschreitend absinkt und nach der 4. Woche mit der Methode von Lohmann-Schumann-Verzár nicht mehr nachweisbar ist.

Die herabgesetzte Glykogenphosphorylierung des denervierten Muskels kann durch Desoxycorticosteronzusatz in vitro nicht gesteigert werden; dieser Umstand weist darauf hin, daß die Abnahme der Glykogenphosphorylierung in denervierten Muskeln nicht auf einen örtlichen Mangel an Nebennierenrindenhormon zurückzuführen ist.

E. Varga, K. Kostya, É. Szabó, L. Aszódi and L. Kesztyüs: *Phosphorylation in denervated muscle.* (Institute of Physiology and Path. Physiology of the University, Debrecen.)

Following the tenth day after intersection of the nerve supply, the glykogen phosphorylising capacity of a denervated muscle gradually decreases and cannot be augmented by the administration of cortin. The decreased phosphorylation in the denervated muscle is not caused by a local shortage in cortin.

Literatur.

[1] Kometiani, P. A.: Biochimija **3**, 663 (1938). — [2] Vesselkin, N. V., and V. M. Vesselkina: Physiology of the USSR. **33/3**, 345 (1947). — [3] Schumann, H.: Pflügers Arch. **243**, 686 (1940). — Verzár, F., u. C. Montigel: Helvet. Chim. Acta **25**, 9, 22 (1949). — Helvet. physiol. Acta **1**, 115 (1943). — [4] Lohmann, K., u. L. Jendrassik: Biochem. Z. **178**, 419 (1927). — [5] Maes, J.: Arch. internat. Physiol. **45**, 135 (1937). — [6] Vesselkina, V. M.: Izv. naucn. Inst. Lesgafta **21 3**, 41 (1938). — [7] Vogt, M.: J. Physiol. **103**, 317 (1944).

Arch. exper. Path. u. Pharmakol. Bd. 210, S. 219—235 (1950).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Vorstand: Prof. Dr. F. Eichholtz).

Über die Ursache der Muskeladynamie bei Nebennierenrinden-Insuffizienz.

Untersuchungen am isolierten Zwerchfell normaler und adrenal-ektomierter Ratten bei veränderten extrazellulären Natrium-, Kalium-, Calcium- und Glukose-Konzentrationen*.

Von
Roland Taugner, Maria Taugner, Thomas Lohmüller,
und Albrecht Fleckenstein.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 7. November 1949.)

Von nicht wenigen Autoren wird die Auffassung vertreten, daß die Hauptfunktion der Nebennierenrinde darin bestehe, die normale Verteilung der K^+- und Na^+-Ionen zwischen dem Extrazellulärraum und dem Zellinnern zu regulieren: Nach Verlust der NNrinde steigt — etwa gleichzeitig mit der einsetzenden Adynamie — der K^+-Spiegel im Blut an, während die Na^+-Werte sinken. Umgekehrt scheint die Rückkehr zur normalen muskulären Leistungsfähigkeit bei Verabreichung von NNrindenhormon von der Normalisierung der Na^+- und K^+-Werte des extrazellulären Raumes abzuhängen; denn schon allein durch NaCl-Gaben können NNrindeninsuffiziente Tiere rasch aus der adynamischen Krise gerettet und — bei gleichzeitiger Einschränkung der K^+-Zufuhr — sogar lange Zeit ohne Hormon am Leben erhalten werden.

Angesichts der außerordentlich zahlreichen Untersuchungen zu diesen speziellen Fragen der NNrinden-Insuffizienz erscheint es eigenartig, daß das hieraus resultierende Grundproblem — die Abhängigkeit der Muskelfunktion von den extrazellulären Kationen-Konzentrationen — bisher am isolierten, vom Kreislauf unabhängigen Warmblütermuskel nicht genau geprüft worden ist. Infolgedessen ist bis heute nicht ganz klar, ob die bei NNrindeninsuffizienz festgestellten Veränderungen im Na^+- und K^+-Gehalt des Plasmas quantitativ ausreichend sind, um als unmittel-

* Die Ergebnisse wurden erstmalig am 18. Mai 1949 in einem Vortrag von Fleckenstein am Physiologischen Institut der Universität Basel (Prof. Verzár) mitgeteilt. Gleichzeitig und unabhängig davon war dort Dr. Voegtli am direkt gereizten Rattenzwerchfell zu ähnlichen Ergebnissen und Schlußfolgerungen hinsichtlich der Wirkung variierter extrazellulärer K^+- und Na^+-Konzentrationen gekommen.

bare Ursache der Adynamie gelten zu können; auch fehlen bisher Angaben, ob Muskeln aus adynamen, adrenalektomierten Tieren ihre Leistungsfähigkeit wiedererhalten, wenn sie isoliert und außerhalb des Organismus in ein normales, K^+-armes und Na^+-reiches Milieu gebracht werden.

Die im folgenden wiedergegebenen Untersuchungen wurden am isolierten, über den N. phrenicus innervierten Zwerchfell* normaler und NNrinden-insuffizienter Ratten ausgeführt. Die Versuche sollten vor allem klären:

1. wie das in einer physiologischen Salzlösung arbeitende, isolierte Zwerchfell durch Variation der Na^+- und K^+-Werte beeinflußt wird;

2. ob und wie weit bei isolierten Zwerchfellen aus völlig adynamen Tieren die Muskelleistung in normaler physiologischer Salzlösung restituierbar ist;

3. ob Zwerchfell-Phrenicus-Präparate aus NNrinden-insuffizienten und aus normalen Ratten bei Aufenthalt im gleichen Elektrolyt-Milieu noch Unterschiede in ihrer Reaktionsweise erkennen lassen.

A. Experimenteller Teil.

Methodik:

Die Zwerchfelle wurden in enger Anlehnung an die Methode von E. Bülbring[1], wie schon im einzelnen beschrieben[2], aus weißen Ratten von 100—250 g Gewicht gewonnen; bei einer Reihe spezieller Versuchs-Anordnungen fand wieder das an unserem Institut entwickelte doppelte Zwerchfell-Phrenicus-Präparat[2] Verwendung. Die isolierten Zwerchfelle wurden am Rippenansatz durch einen Haken auf dem Grunde des Versuchsgefäßes befestigt, während die pars tendinea über einen Faden mit einem isotonischen Hebel (Vergrößerung 1 : 5, Belastung 5 g) verbunden war. Die Registrierung erfolgte auf einem Rußkymographion. Der N. phrenicus wurde — wie in den früheren Versuchen — durch die Bülbringsche Spezialelektrode gezogen und durch Kondensatorentladungen innerhalb einer Reizfrequenz von 4/min—60/min kontinuierlich gereizt. Die Zwerchfelle tauchten jeweils vollständig in die im Versuchsgefäß (100 cm^3 Flüssigkeits-Inhalt) befindlichen Lösungen ein. Ausgangs-Basis für unsere Versuche war eine modifizierte Tyrode-Lösung folgender Zusammensetzung:

$NaCl$	8,0	
$NaHCO_3$	1,0	(= 352 mg% Na^+)
NaH_2PO_4	0,05	
KCl	0,2	(= 10,5 mg% K^+)
$CaCl_2$	0,2	(= 7,2 mg% Ca^{++})
$MgCl_2$.	0,025	(= 0,6 mg% Mg^{++})
Glukose.	2,0	(= 200 mg% Glukose)
Aqu. dest. ad 1000,0		

Natriumbikarbonat und Glukose wurden immer erst kurz vor den Versuchen zugesetzt.

* Über die grundsätzliche Bedeutung des isolierten Rattenzwerchfells für biologische Fragestellungen vgl. O. Riesser, H. Weeke, L. Ther: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (D.) **206**, 12 (1949).

Bei der Prüfung der Einflüsse variierter Kationenkonzentrationen wurde jeweils nur die Konzentration des betreffenden Salzes geändert und die übrige Zusammensetzung der Lösung konstant gehalten. Die Steigerung der K^+-Werte erfolgte durch Zusätze von KCl, die Erhöhung der Ca^{++}-Werte durch $CaCl_2$; bei den Versuchen mit reduziertem NaCl-Gehalt der Lösung wurde die Isotonie durch Glukose hergestellt. Die Lösungen im Versuchsgefäß wurden ausreichend mit Sauerstoff durchperlt. Durch ein Wasserbad wurde eine Temperatur von etwa 36° einreguliert; die zum Auswaschen bestimmten Lösungen wurden jeweils auf die gleiche Temperatur gebracht.

I. Die Reaktionen isolierter Zwerchfelle aus normalen Ratten.

a) Die Wirkung erniedrigter extrazellulärer Na^+-Konzentrationen.

Overton[3] fand 1902, daß ein Froschmuskel bei Entzug des Na^+ in isotonischer Glukoselösung nach kurzer Zeit unerregbar wird. Bis zu einer NaCl-Konzentration von 0,1—0,12% (= 40—47 mg% Na^+) waren die Kontraktionen wenig beeinträchtigt, erst bei Na^+-Werten unter 0,07% NaCl (= 28 mg% Na^+) erloschen die Zuckungen nach elektrischer Reizung vollständig.

Es ist auffällig, daß nach unseren Untersuchungen das isolierte Zwerchfell auf Na^+-Entzug in ganz ähnlicher Weise reagiert: Auch hier geht in reiner isotonischer Glukoselösung die Erregbarkeit rasch verloren; bei Zusatz von NaCl läßt sich die Lähmung schnell wieder beseitigen. Auch am isolierten Rattenzwerchfell hat die Reduktion der Na^+-Werte auf die Hälfte der Norm (180 mg% Na^+) keine oder manchmal eine mäßige Abnahme der Zuckungshöhe zur Folge. Selbst bei 75 mg% Na^+ und bei einer Reizfrequenz von 15/min waren die Zuckungen noch relativ groß. Eine weitere Verarmung an Na^+ verursachte dann aber einen steilen Abfall der Kontraktionen. Ein voller Verlust der Erregbarkeit trat in unseren Versuchen bei 50 mg% Na^+ ein. Dieser Grenzwert liegt also etwa um 25 mg% Na^+ höher als am Froschmuskel.

Die vorliegenden Befunde lassen erkennen, daß erst eine sehr bedeutende Verminderung der extrazellulären Na^+-Konzentration direkt ein Muskelversagen verursachen kann. Die typische Abnahme der Na^+-Werte im Blut nach Adrenalektomie, die zuerst von Baumann und Kurland[4], später von Loeb[5], Harrop[6] sowie anderen Autoren beschrieben worden ist, erreicht nicht derartige Grade: So fanden Baumann und Kurland bei 11 NNrinden-insuffizienten Katzen eine Reduktion des Na^+ im Plasma von 375 mg% auf 320 mg%. Bei Ratten beobachteten Verzár und Laszt[7] einen Abfall von 360 mg% Na^+ auf 250 mg% Na^+ im Mittel; Helve teilte ein Absinken von 321 mg% auf durchschnittlich 300 mg% Na^+ mit. Addison-Kranke können bis um 50% erniedrigte Na^+-Werte aufweisen; aber auch diese Reduktion genügt — beurteilt nach den Ergebnissen am isolierten Zwerchfell — noch keineswegs, um eine Adynamie bis zur Unerregbarkeit zu erzeugen.

b) Die Wirkung erhöhter extrazellulärer K^+-Konzentrationen.

Am quergestreiften Kaltblütermuskel wird durch Erhöhung der extrazellulären K^+-Konzentrationen die Erregbarkeit sehr rasch herabgesetzt. In Versuchen von Overton[8] trat z. B. am isolierten Nerv-Muskel-Präparat vom Frosch in Anwesenheit normaler Ca^{++}- und Na^+-Mengen schon bei 0,05—0,065% KCl (= 26—34 mg% K^+) eine Lähmung der neuromuskulären Überleitung ein. Die Erregungsfortpflanzung im Muskel selbst wurde bei 0,08% KCl (= 47 mg% K^+) aufgehoben. Auch Locke[9] fand als lähmende Grenzkonzentration für den indirekt gereizten, isolierten Sartorius 0,04—0,05% KCl (= 21—26 mg% K^+). Die erregungshemmenden K^+-Konzentrationen liegen noch tiefer, wenn die Na^+- und Ca^{++}-Werte gleichzeitig vermindert sind (Overton[8]).

In unseren Versuchen am isolierten Zwerchfell-Phrenicus-Präparat wurde zunächst bei gleichbleibender Reizfrequenz die K^+-Konzentration

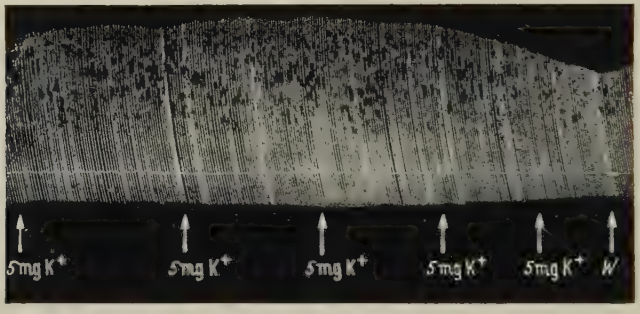


Abb. 1. Linkes Zwerchfell-Phrenicus-Präparat, Reizfrequenz 8/min. Modifiz. Tyrodelösung (K^+-Gehalt 10,5 mg%). Nach 1 Std 20 min Zugabe von 5mal je 5 mg K^+ in Abständen von je 10 min. Bis zu einer Konz. von 25,5 mg% K^+ erfolgt geringe Verbesserung der Kontraktionshöhe; schon bei 30,5 mg% K^+, noch deutlicher aber bei 35,5 mg% K^+ nimmt die Zuckungsgröße ab. Nach dem Auswaschen mit modifiz. Tyrodelösung tritt wieder schnelle Erholung ein.

der Ausgangslösung (10,5 mg% K^+) jeweils in einem zeitlichen Abstand von 5—10 min um je 5 mg% K^+ gesteigert. Bis zu einem Wert von 25,5 mg% K^+ traten dabei an frisch präparierten Zwerchfellen nur unbedeutende Veränderungen ein: Bei langsamer Reizfrequenz 8/min war in dem Konzentrationsbereich von 20—25 mg% K^+ die Kontraktionshöhe oft geringfügig verbessert, bei rascher Frequenz (48/min) blieb sie von 10,5—25,5 mg% K^+ meist gleich. Schon bei 30,5 mg% K^+ nahm dann aber die Zuckungshöhe in den meisten Fällen merklich ab (vgl. Abb. 1 und 2). Bei 35,5 mg% K^+ trat diese Verschlechterung der Muskeltätigkeit regelmäßig auf; schon innerhalb weniger Minuten können solche Zwerchfell-Phrenicus-Präparate hochgradig adynam werden. Bei 40,5 mg% K^+ wurden die Präparate noch schneller und intensiver in ihrer Tätigkeit gehemmt (vgl. Abb. 3 Zwerchfell A). Eine weitere Erhöhung der

K^+-Konzentration führt in allen Fällen sehr rasch zur Unerregbarkeit. Wäscht man jetzt mit einer Lösung von normalem K^+-Gehalt (10,5 mg% K^+) aus, so erfolgt prompte Erholung, und in den meisten Fällen wird

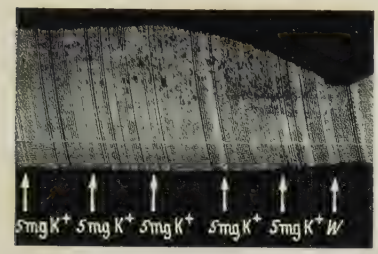


Abb. 2. Dasselbe Präparat wie in Abb. 1. Wiederholung des gleichen Versuchs 1 Std später, doch Abstand zwischen den einzelnen K^+-Gaben von nur je 5 min: Das Zwerchfell reagiert wieder in derselben Weise.

innerhalb weniger Minuten die frühere Zuckungshöhe wieder erreicht. Der Leistungsabfall des Zwerchfell - Phrenicus - Präparats tritt also in einem Konzentrations-Bereich ein, der nur wenig über den K^+-Werten liegt, die den Froschmuskel bei indirekter Reizung lähmen. Dieser Abfall der Leistung dürfte auch am Zwerchfell zunächst in einer Verschlechterung der neuromuskulären Überleitung begründet sein.

Die am isolierten Muskelpräparat des Warmblüters zur Adynamie führende extrazelluläre K^+-Konzentration liegt also erstaunlich niedrig. Vergleicht man damit die bei NNrinden-Insuffizienz im Blut und Plasma gefundenen K^+-Werte, so ergibt sich eine überraschende Übereinstimmung: Baumann und Kurland[4] beobachteten als erste die nach doppelseitiger Adrenalektomie einsetzende K^+-Erhöhung; sie fanden bei 11 Katzen im Plasma vor der Operation im Mittel 19,0 mg% K^+, nachher 28,0 mg% K^+. In Versuchen von Zwemer und Sullivan[10] zeigten normale Katzen im Serum 15—22 mg% K^+, bei NNrinden-losen Tieren

Abb. 3. Doppeltes Zwerchfell-Phrenicus-Präparat. Reizfrequenz 40/min. Modifiz. Tyrodelösung mit einem K^+-Gehalt von 20,5 mg%. Oben linkes Zwerchfell A: normaler Ca^{++}-Gehaltvon 7,2 mg%. Unten rechtes Zwerchfell B: erhöhter Ca^{++}-Gehalt von 21,6 mg%. Zu beiden Präparaten werden in Abständen von je 5 min je 10 mg% K^+ bis zum Eintritt der K^+-Lähmung zugegeben. Bei normalem Ca^{++}-Gehalt (Zwerchfell A) erfolgt Abfall der Kontraktionshöhe bis zur Unerregbarkeit bei 40,5 mg% K^+. Bei dem erhöhten Ca^{++}-Gehalt von 21,6 mg% (Zwerchfell B) tritt der Abfall erst bei 60,5 mg% K^+ ein. Weiterer Zusatz von 3 mal 14,4 mg Ca^{++} bei Zwerchfell B bis auf eine Gesamtkonzentration von 65 mg% Ca^{++} verhindert die völlige Lähmung. Auswaschen mit K^+-freier modifiz. Tyrodelösung verursacht in beiden Fällen prompte Erholung.

(22 Bestimmungen) stieg dagegen das K^+ auf 34,7 mg% an; in späteren Stadien der Insuffizienz wurden noch höhere Werte gefunden. In einer Versuchsreihe von Truszkowski nud Zwemer[11] war bei 19 männlichen Katzen (3,5—4 kg Gewicht) der Mittelwert des K^+ im Plasma 19,3 mg% (Streuung 14—23,1 mg%); nach bilateraler Adrenalektomie nahm das K^+ des Plasmas innerhalb von 3 Tagen bis auf 36,4 mg% zu. Die höchsten Werte, die am Tage des Todes oder am Tage vorher gefunden wurden, waren bei 2 Tieren 44,4 mg% bzw. 45,7 mg% K^+. Urechia, Benetato und Retezeanu[12] teilten ähnliche K^+-Erhöhungen bei Katzen mit. Bei Menschen (24 sichere Addison-Kranke) gaben Marañon und Collazo[13] 31,1 mg% K^+ im Plasma als Mittelwert aus 33 Bestimmungen an; die bei 3 komatösen Kranken gefundenen Werte lagen mit 49,5 mg%, 37,4 mg%, 48,9 mg% K^+ noch wesentlich höher. Der Mittelwert von Helve[14] bei 12 adrenalektomierten Ratten war 43 mg% K^+ (Streuung 34—51 mg% K^+); 8 normale Tiere hatten im Mittel 27 mg% K^+ (Streuung 21—30 mg%). *Es kann nach unseren Versuchen am isolierten Zwerchfell-Phrenicus-Präparat also kein Zweifel mehr sein, daß diese K^+-Werte des NNrinden-insuffizienten Tieres schon für sich allein zur Erklärung der Muskeladynamie genügen*; die gleichzeitige Erniedrigung der Na^+-Werte wird diese lähmenden K^+-Wirkungen noch begünstigen (vgl. Overton[8]).

c) Die Wirkung erniedrigter extrazellulärer Kalium- und Glukose-Konzentrationen.

Durch zahlreiche Untersuchungen (Fenn und Mitarbeiter, Tipton, Reginster; Wood, Collins und Moe; Somogyi und Verzár u. a. Literatur siehe bei Fleckenstein[15]) ist gesichert, daß die Muskelfasern bei der Kontraktion K^+-Ionen nach außen abgeben und dafür eine äquivalente Menge Na^+-Ionen aufnehmen. Dieser Kationenaustausch wird heute fast allgemein als die dem Aktionsstrom zugrundeliegende Reaktion angesehen. Während der oxydativen Erholung werden K^+-Ionen wieder gebunden und Na^+-Ionen nach außen abgeschoben. Es ist zu erwarten, daß diese Rückbindung von Kalium erschwert wird und eine Verarmung der Fasern an K^+ eintritt, wenn die Muskeln in einer K^+-freien Lösung tätig sind. Wir prüften daher, ob und wie lange das isolierte Zwerchfell auch in K^+-freier Lösung arbeitsfähig bleibt, bzw. ob durch Zusatz von K^+ zu einer K^+-freien Lösung die Muskeltätigkeit verbessert werden kann.

Es ergab sich nun, daß das isolierte Rattenzwerchfell auch ohne extrazelluläres K^+ bei einer Reizfrequenz von 48/min unter Umständen sogar über einige Stunden erregbar bleibt. Trotzdem zeigte sich regelmäßig, daß die Muskeltätigkeit in K^+-freier Lösung nicht optimal ist; denn die Höhe der Zuckungen nimmt in K^+-freier Lösung schneller als

gewöhnlich ab; nach 2 Std sind die Kontraktionen nur noch gering. Es tritt in solchen Fällen aber im Laufe von wenigen Minuten eine bedeutende Erholung ein, wenn man KCl zusetzt. Schon durch 5 mg% K^+ wird die Zuckungshöhe prompt gesteigert, eine schrittweise Erhöhung der K^+-Konzentrationen — jeweils um 5 mg% — bis zu 20 mg% K^+ verbessert

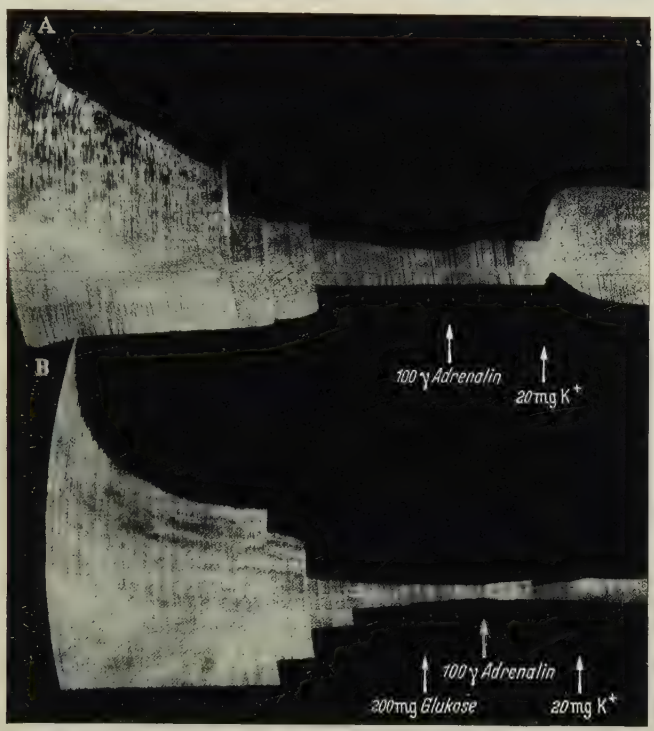


Abb. 4. Doppeltes Zwerchfell-Phrenicus-Präparat in K^+-freier modifiz. Tyrodelösung, Reizfrequenz 40/min. Oben linkes Zwerchfell A: K^+-freie Lösung mit 200 mg% Glukose. Unten rechtes Zwerchfell B: K^+-freie Lösung ohne Glukose. Nach 20 min Tätigkeit wird durch 3maliges Abstellen des Kymographions für je 15 min der beschleunigte Abfall der Zuckungsgrößen in K^+-freier Lösung besonders deutlich gemacht. Bei Zwerchfell B (ohne Glukose) steigt die Grundlinie der Arbeitskurve stärker als bei A an. Nach 100 min Tätigkeit werden beiden Zwerchfellen je 100 γ Adrenalin zugesetzt und 10 min später 20 mg K^+ in die K^+-freien Lösungen gegeben. Nur Zwerchfell A, das von Anfang an in Glukosehaltigem Milieu tätig war, reagiert auf den K^+-Zusatz mit einer raschen Verbesserung der Zuckungsgröße. Zwerchfell B, das erst 15 min vor dem K^+-Zusatz 200 mg% Glukose erhielt, reagiert auf K^+ noch nicht. (Der Anstieg der Grundlinie bei Arbeitsleistung in Glukose-freier Lösung ist meist deutlicher ausgeprägt als Zwerchfell B erkennen läßt [vgl. z. B. Abb. 5.]; andererseits ist bei Zwerchfell A die verbessernde Wirkung des K^+-Zusatzes etwas größer als im Durchschnitt).

noch weiter; doch ist die Wirkung der ersten 5 mg% K^+ größer als die der folgenden Gaben. Am frischen Zwerchfell-Präparat, d. h. innerhalb der ersten 30 min nach Beginn der Tätigkeit in K^+-freiem Milieu, ist im allgemeinen bei K^+-Zusatz noch keine Zunahme der Kontraktionshöhe festzustellen; besonders ausgeprägt sind dagegen die Effekte, wenn die

Zwerchfelle schon längere Zeit in K^+-freier Lösung gearbeitet haben (vgl. Abb. 4 Zwerchfell A). Aber auch weitgehend ermüdete Präparate, die bei einer K^+-Konzentration von 10,5 mg% stundenlang tätig waren, zeigen bei 20,5 mg% K^+ noch eine gewisse Steigerung der Kontraktionshöhe*.

Auffällig ist, daß der K^+-Zusatz die Leistung von Muskeln, die in K^+-freier Lösung ermüdet sind, nur dann verbessern kann, wenn in dieser Lösung Glukose vorhanden war. Ist das Zwerchfell, wie Abb. 4 (Zwerchfell B) und Abb. 5 zeigen, in einer Lösung ermüdet, die weder Kalium noch Glukose enthielt, so ist der K^+-Zusatz meist ohne jeden Effekt. Die dargelegten Befunde sprechen dafür, daß der beschleunigte Leistungsabfall

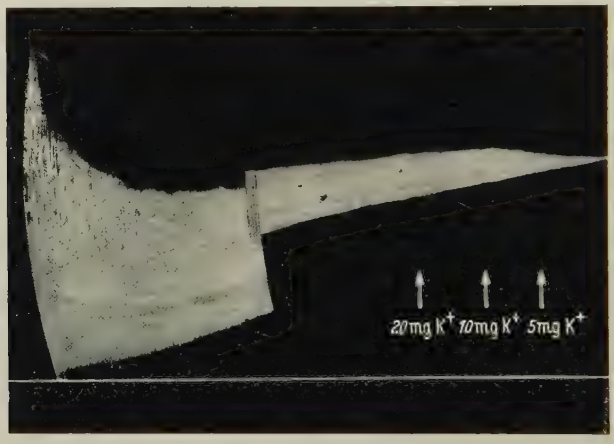


Abb. 5. Linkes Zwerchfell-Phrenicus-Präparat, Reizfrequenz 40/min. Modifiz. Tyrodelösung ohne K und ohne Glukose. Schon nach 15 min beginnt die Grundlinie der Arbeitskurve immer mehr anzusteigen. Nach 25 min Tätigkeit Abstellen des Kymographions für 15 min, um die Ausbildung der Kontraktur während dieser Zeit noch besser zu demonstrieren. Zugabe von 20 mg K^+ nach 55 min hat in dem Glukose-freiem Milieu keinerlei Verbesserung der stark reduzierten Zuckungsamplitude zur Folge. Bei 35 mg% K^+ erfolgt wie gewöhnlich beschleunigter Abfall der Zuckungshöhe bis zur Unerregbarkeit.

in K^+-freier Lösung tatsächlich auf eine K^+-Verarmung der Faser zurückzuführen ist; durch K^+-Zusätze in die K^+-freie Lösung wird dann offenbar eine Wiederauffüllung der angegriffenen K^+-Bestände ermöglicht. Eine solche Ionen-Verschiebung gegen das Gefälle kann nur durch restitutive Stoffwechsel-Prozesse vollzogen werden; hierbei ist Glukose zur Deckung des Energieaufwands nötig.

* Nach alten Befunden von Ringer[16] sowie Mines[17] werden auch die Kontraktionen eines Froschmuskels, der vorher in physiologischer Kochsalz-Lösung durch kontinuierliche Reizung ermüdet worden ist, durch Zusatz geringer Mengen KCl wieder verbessert. Auch am Speicheldrüsen-Gewebe wird nach Brock, Druckrey u. Herken[18] für die Erholung Kalium benötigt.

Wichtig erscheint uns auch ein weiteres Phänomen, das in einer Lösung ohne Glukose fast immer eintritt: Schon nach 20 min steigen bei einer Reizfrequenz von 40/min die Grundlinien der Arbeitskurven merklich an, und die Zwerchfelle gehen unter dauernder Abnahme der Zuckungsamplitude immer mehr in Kontraktur (vgl. Abb. 5 sowie Abb. 4 Zwerchfell B). Schon nach 1 Std sind die Zwerchfelle oft hochgradig verkürzt und nach 1½—2 Std in diesem Zustand kaum mehr erregbar. Eine solche Arbeitskurve ist der Arbeitskurve eines mit Monojodacetat vergifteten Froschmuskels (LUNDSGAARD[19]) ähnlich. Die Insuffizienz des restitutiven Stoffwechsels, die bei Arbeitsleistung in glukosefreier Lösung eintritt, kann also auch am Warmblütermuskel in einer Hemmung der Erschlaffung zum Ausdruck kommen. Das Ausmaß dieser Reaktion scheint jedoch nicht wenig vom Fütterungszustand der Tiere vor der Zwerchfell-Präparation abzuhängen. Schwer zu erklären ist bis jetzt der Umstand, daß sich die Kontrakturen in glukose-freier Lösung nicht selten auch spontan nach 1½—2 Std wieder etwas zurückbilden können; die Zuckungsamplitude vergrößert sich dabei allerdings kaum. Diese Verhältnisse — besonders der Einfluß von K und Glukose auf die Erholung — werden unter Verwendung des doppelten Zwerchfell-Phrenicus-Präparats noch weiter untersucht.

Ein derartiger Zusammenhang von Stoffwechsel und Motorik ist bisher in voller Deutlichkeit nur bei der Erschlaffung des Froschrectus nach Kalium- und Azetylcholin-Kontrakturen in Erscheinung getreten, bei denen Sauerstoffentzug, Vergiftung des WARBURGschen Ferments, Hemmung der Oxydationsprozesse im Zitronensäure-Zyklus oder Blockierung des Kohlenhydrateabbaues in der anaeroben Phase (Monojodazetat) im Prinzip stets die gleiche Hemmung der Wiederverlängerung zur Folge haben (FLECKENSTEIN, BROSE, CANIS und FÖRDERER[20]). Die gleiche energetische Insuffizienz, begleitet von einer Kontraktur, tritt auch am erstickenden Muskel auf (Ischämische Kontraktur, Totenstarre, vgl. WINTERSTEIN[21]).

d) Die Wirkungen variierter extrazellulärer Ca^{++}-Konzentrationen.

Wie LOCKE[22] zuerst fand, verliert ein Nerv-Muskel-Präparat vom Frosch in reiner NaCl-Lösung reversibel seine indirekte Erregbarkeit; bei Zusatz von Ca^{++}-Salzen kehrt die Erregbarkeit zurück. Auch das isolierte, über den N. phrenicus gereizte Zwerchfell wird nach unseren Versuchen in Abwesenheit von $CaCl_2$ innerhalb von 10—15 min gelähmt. Durch $CaCl_2$ läßt sich auch hier die Funktion fast vollständig restituieren. Entsprechend den am Froschmuskel bekannten Verhältnissen scheinen Zwerchfelle in Ca^{++}-freier Lösung besonders K^+-empfindlich zu sein; denn in Abwesenheit von Ca^{++}-Ionen trat bereits bei 30—35 mg% K^+ schnell eine vollständige Lähmung ein. Die Erhöhung der $CaCl_2$-Konzentrationen auf 40—60 mg% (14,4—21,6 mg% Ca^{++}) hatte den umgekehrten Effekt; sie ließ die K^+-Lähmung erst bei einer Konzentration von

50—60 mg% K^+ in Erscheinung treten (vgl. Abb. 3 Zwerchfell B). Froschmuskel und Säugetiermuskel zeigen also auch gegenüber der Variation der Ca^{++}-Werte ein ziemlich übereinstimmendes Verhalten. Nach Lucke und Heckmann[23] sowie Marañon und Collazo[13] sind die Ca^{++}-Werte im Blut bei NNrinden-Insuffizienz nicht verändert.

II. Die Reaktionen isolierter Zwerchfelle aus NNrinden-insuffizienten Ratten.

a) Methodisches.

Bei der Auswahl der NNrinden-insuffizienten Tiere wurde sehr sorgfältig verfahren. Es kamen weiße Ratten von 120—185 g aus Versuchsserien von Eichholtz, Hotovy, Collischonn, Knauer[24] und von Neukamm[25] zur Verwendung, bei denen die Entwicklung der Insuffizienz-Symptome nach doppelseitiger — in Avertinnarkose durchgeführter — Adrenalektomie genau verfolgt worden war. Zur Testierung wurde dabei neben der Kontrolle des allgemeinen Verhaltens, des Kotes, Blutdrucks und der Hämo-Konzentration besonders auch die Avertin-Schlafzeit herangezogen. Die Sicherung der eingetretenen adynamischen Krise* erfolgte nach Möglichkeit durch die neue Methode von Eichholtz, Hotovy und Erdniss[26] am elektrisch gereizten M. Masseter. Diese neue Methode ist besonders gut geeignet, ohne besonderen operativen Eingriff am gleichen Tier wiederholte Prüfungen der Muskelleistung vorzunehmen und die Insuffizienz auf dem Höhepunkt zu erfassen: Während nämlich vor der Exstirpation die Leistung der Kaumuskulatur über viele Stunden annähernd gleichmäßig bleibt, kommt es, wie schon von Eichholtz, Hotovy und Erdniss[26] näher beschrieben, in der adynamischen Krise in wenigen Minuten zur Erschöpfung. Die in den folgenden Untersuchungen verwendeten Zwerchfelle waren ausschließlich aus völlig adynamen Tieren — meist kurz vor dem zu erwartenden Tod — gewonnen; in einigen Fällen wurde die Präparation erst nach eingetretenem Atmungsstillstand durchgeführt.

b) Das Verhalten in modifizierter Tyrode-Lösung.

Es ergab sich nun als wesentlichste Tatsache, daß Zwerchfelle aus NNrinden-losen, völlig adynamen Tieren in unserer modifizierten Tyrode-Lösung stundenlang arbeiten. Irgendwelche auffälligen Unterschiede im Verhalten gegenüber Zwerchfell-Phrenicus-Präparaten aus normalen

* Das entscheidende Symptom für die eingetretene adynamische Krise ist allein das völlige Versagen der Muskulatur, das meist ziemlich akut (innerhalb ½—mehrere Stunden) einsetzt. Die Hämokonzentration und der niedere Blutdruck sind bei der NNrinden-insuffizienten Ratte in der Regel schon vorher ausgebildet und daher für die Testierung der eigentlichen Krise weniger brauchbar.

Ratten traten dabei nicht hervor. Auch die Zuckungshöhe und die Überlebenszeit nach der Präparation waren nicht einwandfrei verringert. In Tab. 1 ist als Beispiel ein Überblick über 5 genau getestete Tiere gegeben, deren Zwerchfelle — im terminalen Stadium isoliert — außerhalb des Organismus wieder gut funktionstüchtig wurden. Bei Tier Nr. 3 war z. B. im Masseter-Versuch nach 5 min völlige Erschöpfung eingetreten, das isolierte Zwerchfell arbeitete aber hinterher noch 4 Std; Tier Nr. 4 versagte im Masseter-Versuch nach 14 min, das isolierte Zwerchfell war dagegen noch nach 3 Std normal tätig (der Versuch wurde abgebrochen). Tier Nr. 5 führte im Masseter-Versuch (ohne Narkose) nur noch 24 min lang kleine Zuckungen aus; das nach dem Atmungsstillstand herauspräparierte Zwerchfell arbeitete jedoch in unserer Tyrode-Lösung, unterstützt durch geeignete Gaben von Adrenalin und Prostigmin, noch 10 Std. Die Muskulatur des NNrinden-insuffizienten Tieres kann also außerhalb des Organismus, d. h. in einem K^+-ärmeren Milieu ihre Leistungsfähigkeit weitgehend zurückgewinnen.

Tabelle 1. *Überblick über 5 genau getestete Tiere.*

Nr.	Gewicht Geschlecht	Insuffizienzsymptome: Durchfall	Blutdruck mm Hg	Erythrozyten im mm^3	Schlafzeit nach Avertin	Adynamie	Zeitpunkt der Zwerchfellpräparation nach Adrenalektomie	Zeitpunkt des völligen Muskelversagens im Masseter-Test	Arbeitszeit der isolierten Zwerchfelle
1	180 g ♀	+	40 [65]	9,5 Millionen	Kein Erwachen	+ + +	4 Tage	—	4 Std 25 min
2	185 g ♀	+	34 [65]	10,8 Millionen	22 min	+ + +	5 Tage	—	7 Std 15 min
3	170 g ♀	(+)	30 [60]	—	12 min [7 sec]	+ + +	3 Tage	nach 5 min	4 Std
4	120 g ♂	+ +	28 [60]	—	16 min [52 sec]	+ + +	4 Tage	nach 14 min	nach 3 Std bei guter Leistung abgebrochen
5	125 g ♂	(+)	28 [65]	—	15½ min [52 sec]	+ + +	9 Tage (nach Atemstillstand isoliert)	nach 24 min	10 Std

[ ] = Werte vor Adrenalektomie.

Die unmittelbare Ursache des akuten Muskelversagens liegt also offenbar nicht im Muskel selbst, sondern in der pathologischen Zusammensetzung der extrazellulären Flüssigkeit*.

c) Das Verhalten gegenüber Prostigmin, Adrenalin und Kalium.

Zuckungshöhe und Überlebenszeit isolierter Zwerchfelle aus normalen Ratten können durch geeignete Gaben von Prostigmin und Adrenalin verbessert werden (Bülbring[1], Taugner und Fleckenstein[2]). Es wurde daher geprüft, ob auch die isolierten Zwerchfelle aus NNrinden-insuffizienten Ratten die gleiche Beeinflußbarkeit durch diese Pharmaka zeigen.

Abb. 6. Linkes Zwerchfell-Phrenicus-Präparat einer NNrinden-insuffizienten Ratte (Tier Nr. 5) Reizfrequenz 40/min. Nach 6 Std Tätigkeit steigt nach 2 Gaben von je 10 γ Adrenalin — in Gegenwart von 0,4 γ Prostigmin — die Arbeitskurve an. Nach dem Auswaschen Rückkehr zur Norm.

Tatsächlich reagieren nun solche Zwerchfelle in der modifizierten Tyrode-Lösung auch auf Prostigmin und Adrenalin ganz normal; in Abb. 6 ist z. B. am Zwerchfell von Tier Nr. 5 nach 6 Std Tätigkeit die Wirkung von $2 \times 10\ \gamma$ Adrenalin in Gegenwart von 0,4 γ Prostigmin wiedergegeben; eine entsprechende Reaktion war auch noch nach 8 Std Tätigkeit durch wiederholte Gaben von 10 γ Adrenalin zu erhalten. Bei einem anderen Zwerchfell-Präparat wurden 10 γ Prostigmin (Frequenz 40/min) zugesetzt und dabei die gleiche zweiphasige — zuerst verbessernde, dann verschlechternde — Wirkung beobachtet, die auch am Zwerchfell aus normalen Tieren für solche Prostigminmengen charakteristisch ist. Diese Befunde sind um so auffälliger, als adyname NNrindeninsuffiziente Ratten im Masseter-Test auf Prostigmin (und Adrenalin) nicht reagieren (Neukamm[25]), während normale Ratten nach

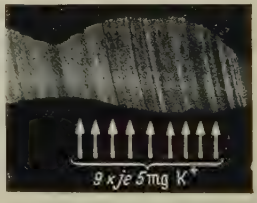


Abb. 7. Dasselbe Präparat wie in Abb. 6. Reizfrequenz 40/min. Nach 7 Std Tätigkeit Übergang auf K^+-freie Lösung, in der die Zuckungshöhe abnimmt. 30 min später werden 9 mal je 5 mg K^+ im Abstand von je 2½ min zugegeben. Bei der K^+-Konzentration von 5—15 mg% wird die Zuckungshöhe verbessert, von 35 mg % K^+ an nimmt die Kontraktionsgröße — wie gewöhnlich — ab.

* In Versuchen von Hirase[27] wurden M.gastrocnemii von Eskulenten 24 Std nach NNrinden-Exstirpation isoliert und in einer feuchten Kammer bis zur Ermüdung gereizt. Die Dauer der Erregbarkeit und die Arbeitsleistung war im Vergleich zu den Kontrollen etwas verringert, lag aber nicht außerhalb des mittleren Fehlers. Ochoa[28] fand bei ähnlicher Versuchsanordnung — aber in Stickstoffatmosphäre — maximal eine um 40% erniedrigte Muskelleistung; diese Muskeln wurden nach der Präparation jedoch nicht in Ringer-Lösung gespült!

1,5—5 γ Prostigmin/100 g regelmäßig eine um das 2—3fache gesteigerte Masseter-Leistung zeigen (vgl. EICHHOLTZ, HOTOVY, ERDNISS[26]).

Auch die Empfindlichkeit der Zwerchfelle aus NNrinden-insuffizienten Ratten gegenüber einer Steigerung der extrazellulären K^+-Konzentration unterscheidet sich nicht von der Norm (vgl. Abb. 7). In unseren Versuchen verschlechterten 35 mg% K^+ die Muskelleistung meist schon bedeutend, bei 40 mg% K^+ trat Unerregbarkeit ein. Die verbessernden Effekte geringer K^+-Zusätze (5—20 mg% K^+) nach Ermüdung in K^+-freiem Milieu waren in einigen Fällen ebenfalls deutlich, in anderen Fällen aber weniger ausgeprägt. Zwerchfelle aus NNrinden-insuffizienten Ratten zeigten in glukosehaltiger, K^+-freier Tyrodelösung keine Kontrakturen; man muß hieraus schließen, daß auch die Verwertung von Glukose bei diesen Zwerchfellen nicht wesentlich gestört ist.

B. Besprechung.

Die dargelegten Untersuchungen haben am isolierten Zwerchfell-Phrenicus-Präparat der Ratte den Nachweis erbracht, daß die bei NNrinden-Insuffizienz eintretende K^+Erhöhung im extrazellulären Raum für das Versagen der Muskulatur in der adynamischen Krise ausschlaggebend ist:

a) Die im Plasma von adynamen, adrenalektomierten Tieren gefundenen K^+-Werte (35—45 mg% K^+) sind mit den K^+-Konzentrationen identisch, die die Tätigkeit des isolierten Rattenzwerchfells lähmen;

b) isolierte Zwerchfelle aus völlig adynamen, NNrinden-insuffizienten Ratten arbeiten und reagieren wieder wie Zwerchfelle aus normalen Tieren, wenn sie in ein normales, K^+-armes Milieu gebracht werden.

Unsere Ergebnisse stehen damit in voller Übereinstimmung mit der Auffassung von HASTINGS und COMPERE[29], ZWEMER und SULLIVAN[10], ZWEMER und TRUSZKOWSKI[30], MARAÑON und COLLAZO[13], NILSON[31] und anderen Autoren, die in dem K^+-Anstieg des Plasmas das Hauptsymptom der NNrinden-Insuffizienz sahen; so konnten bereits ZWEMER und TRUSZKOWSKI[30] zeigen, daß alle typischen Symptome der NNrinden-Insuffizienz (Abmagerung, Muskelschwäche, niederer Blutzucker, niederes Blut-Na^+, hoher Rest-N-Wert, degenerative Nierenveränderungen, Tod durch Herzstillstand in Diastole oft mit erheblicher Dilatation) an sonst gesunden Tieren reproduziert werden können, wenn man den K^+-Gehalt des Plasmas über einige Zeit auf einem Wert von 30—40 mg% K^+ hält.

Die Abnahme der extrazellulären Na^+-Werte bei NNrinden-Insuffizienz dürfte dagegen nach unseren Versuchen am isolierten Zwerchfell für das Muskelversagen erst indirekt von Bedeutung sein. Die hervorragende Wirkung der NaCl-Therapie bei NNrinden-Insuffizienz (vgl.

Rogoff und Stewart[32]; Banting und Gairns[33]; Marine und Baumann[34]; Corey[35]; Loeb[5]; Harrop und Mitarbeiter[6]; Swingle und Mitarbeiter[36]) erklärt sich wohl am besten durch ein Zurückdrängen der antagonistischen K^+-Ionen. Beim Auffüllen des extrazellulären Raumes mit NaCl-haltiger Flüssigkeit wird die extrazelluläre K^+-Konzentration wieder erniedrigt, und die K^+-Ausscheidung durch die Niere steigt an. Ohne NaCl-Zufuhr vermögen NNlose Tiere ihre K^+-Werte im Serum nicht einzuregulieren (Nilson[31]). Außerdem beseitigt Kochsalz die Kollaps-Bereitschaft des NNrinden-insuffizienten Organismus, die sich wohl ebenfalls sehr ungünstig auf die Muskelleistung auswirkt. Im Masseter-Versuch kann bei adynamen Ratten allein die Injektion einer NaCl-Lösung (z. B. 5 cm^3 Tyrodelösung intraperitoneal) die abgesunkene Muskeltätigkeit wieder verbessern, während Adrenalin, Prostigmin sowie künstliche O_2-Beatmung gänzlich ohne Effekt sind (Neukamm[25]). Rubin und Krick[37] hielten adrenalektomierte Ratten durch Zufütterung einer Salzlösung, deren Zusammensetzung dem normalen Plasma entsprach, über Wochen ohne Hormon in gutem Zustand; in Versuchen von Martin und Fazekas[38] wurde bei weiblichen Ratten in 55% der Fälle durch NaCl-Verabreichung auch die Hypophysen-Ovarial-Tätigkeit wiederhergestellt. Bei Zufuhr von NaCl, Natriumzitrat und K^+-Reduktion in der Nahrung (auf unter 200 mg K^+/Tag) können Hunde nach Allers und Kendall[39] monatelang ohne Hormon die Adrenalektomie überleben.

Wie bereits in Kap. Ic kurz erwähnt, sind die K^+- und Na^+-Ionen bei Kontraktion und Erregung aktiv beteiligt. Schon von Overton[3, 8] wurde die Vermutung ausgesprochen, daß bei der Erregung des Muskels K^+-Ionen austreten und Na^+-Ionen eindringen; die Erregung würde daher unmöglich, wenn keine extrazellulären Na^+-Ionen für den Eintritt ins Innere der Fasern zur Verfügung stünden, oder wenn bei Erhöhung der extrazellulären K^+-Werte der K^+-Austritt nicht mehr über das notwendige Diffusionsgefälle erfolgen könne. Diese Deutung der Muskellähmung durch K^+-Erhöhung sowie durch Na^+-Entzug hat auch heute noch Gültigkeit; das Muskelversagen bei NNrinden-Insuffizienz ist von Fleckenstein[15]) schon 1942 so erklärt worden. Bei dem Austausch von K^+ und Na^+ können in Anbetracht des hohen Diffusionsgefälles, über das sich diese Kationenbewegungen bei der Kontraktion vollziehen, außerordentlich große Energiemengen gewonnen werden; so kann z. B. 1 γ K^+ im Austausch gegen Na^+ etwa 4gcm Arbeit liefern. Von Fleckenstein[15] ist daher schon mehrfach darauf hingewiesen worden, daß in diesen hohen Ungleichgewichten zwischen der extra- und intrazellulären Kationenverteilung wahrscheinlich der primäre Energiespeicher für die Muskelkontraktion gesehen werden müsse. *Bei NNrinden-Insuffizienz sinken diese Konzentrations-Unterschiede, und die daraus zu beziehende Energie nimmt ab.*

Nach Verzár wird die Regulation des K^+ und Na^+ durch den Kohlenhydrat-Stoffwechsel vollzogen. Der K^+-Anstieg und Na^+-Abfall im Plasma des adrenalektomierten Tieres beruht nach dieser Auffassung auf einer primären Störung im Zellstoffwechsel. Diese Abhängigkeit von energieliefernden Prozessen ist bei Ionenverschiebungen gegen das Gefälle schon aus thermodynamischen Erwägungen heraus zu fordern; dementsprechend ist auch, wie Verzár und Mitarbeiter[40] fanden, die intrazelluläre K^+-Bindung eng mit dem restitutiven Kohlenhydratstoffwechsel und speziell mit der oxydativen Glykogen-Resynthese verknüpft. Auch unsere in Kap. I c wiedergegebenen Befunde machen wahrscheinlich, daß bei der Erholung des Muskels eine Rückbindung von K^+ erfolgt und daß dabei Glukose zur Deckung des Energie-Aufwands benötigt wird. Unsere Ergebnisse lassen aber andererseits auch erkennen, daß für das Versagen der NNrinden-insuffizienten Muskulatur in der adynamischen Krise *nicht* in erster Linie eine Störung des Muskel-Stoffwechsels, sondern der Anstieg des extrazellulären K^+ entscheidend ist. *Die kritische Adynamie wird dem Muskel also von außen aufgezwungen.* Durch diesen Nachweis verlagern sich nicht wenige Probleme der NNrinden-Insuffizienz vom Muskel weg auf die anderen, im Na^+- und K^+-Stoffwechsel regulierend wirkenden Organe, d. h. auf die Leber und besonders auf die Niere. Damit soll selbstverständlich nicht gesagt werden, daß der Muskelstoffwechsel bei NNrindeninsuffizienz vollkommen intakt sei oder daß er keine Abhängigkeit von den NNrindenhormonen zeige.

Nach der Auffassung von Harrison und Darrow[41], Darrow, Harrison und Taffel[42] sowie von anderen Autoren, sollen die wesentlichsten Auswirkungen des NNrindenverlustes auf den K^+- und Na^+-Haushalt am einfachsten durch eine Störung der Nierenfunktion zu erklären sein. Die Tubuli verlieren die Fähigkeit zur Rückresorption von Na^+, und die K^+-Ausscheidung nimmt ab (vgl. hierzu auch H. Wirz[43]). Ob diese einfache Deutung allerdings für sich allein schon genügt, um alle Seiten der Mineralstoffwechsel-Störungen bei NNrinden-Insuffizienz verständlich zu machen, erscheint sehr fraglich und bedarf noch weiterer Untersuchungen.

C. Zusammenfassung.

1. Isolierte, über den N. phrenicus gereizte Zwerchfelle aus normalen Ratten werden rasch unerregbar, wenn der extrazelluläre Na^+-Gehalt der modifiz. Tyrode-Lösung auf 50 mg% Na^+ erniedrigt oder der extrazelluläre K^+-Gehalt auf 35—45 mg% erhöht wird. Ca^{++}-Entzug führt nach 10—15 min zu Unerregbarkeit. Alle diese Lähmungen sind reversibel.

2. In K^+-freier modifiz. Tyrode-Lösung tritt — offenbar durch K^+-Verarmung der Muskelfasern — vorzeitige Erschöpfung ein. Bei Zusatz von 5—20 mg% K^+ wird die Muskeltätigkeit wieder verbessert; diese Reaktion zeigt Abhängigkeit vom restitutiven Stoffwechsel.

3. Ausschlaggebend für das Versagen der Muskulatur bei NNrinden-Insuffizienz ist der abnorme Anstieg des extrazellulären K^+. Die im Plasma von adynamen adrenalektomierten Tieren gefundenen K^+-Werte (35—45 mg%) sind mit den K^+-Konzentrationen identisch, die die Tätigkeit des isolierten Ratten-Zwerchfells lähmen.

4. Die Muskulatur NNrinden-insuffizienter Ratten gewinnt bei normalen extrazellulären K^+-Werten ihre Leistungsfähigkeit zurück: Isolierte Zwerchfelle aus völlig adynamen Tieren arbeiten in modifiz. Tyrode-Lösung wieder stundenlang; Zuckungshöhe, Überlebenszeit und die Reaktion auf Adrenalin, Prostigmin und auf K^+-Erhöhung sind gegenüber Zwerchfellen aus normalen Ratten nicht deutlich verändert.

5. Bei Arbeit in glukosefreier Lösung zeigen isolierte Zwerchfelle unvollständige Erschlaffung und bleiben häufig in Kontraktur-Stellung stehen; die Zwerchfelle reagieren also ohne Glukose u. U. ähnlich wie Monojodazetat-vergiftete Muskeln. Zwerchfelle aus NNrinden-insuffizienten Tieren zeigen in Glukose-haltiger Lösung keine Kontraktur; sie können demnach Glukose verwerten.

6. Für das Versagen der NNrinden-insuffizienten Muskulatur in der terminalen Krise ist also nicht in erster Linie eine Störung des Muskel-Stoffwechsels entscheidend: Die kritische Adynamie wird dem Muskel hauptsächlich wohl infolge des Versagens der anderen — an der K^+- und Na^+-Regulation beteiligten — Organe von außen aufgezwungen.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden auf Veranlassung und unter Leitung von Herrn Prof. Eichholtz in den Dissertations-Arbeiten von R. Taugner, M. Taugner und Th. Lohmüller durchgeführt.

Literatur.

[1] Bülbring, E.: J. Pharmacol. (Brit.) **1**, 38 (1946). — [2] Taugner, R., u. A. Fleckenstein: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (D.) **209**, 286 (1950). — [3] Overton, E.: Pflügers Arch. **92**, 346 (1902). — [4] Baumann, E. J., u. S. Kurland: J. biol. Chem. (Am.) **71**, 281 (1926). — [5] Loeb, R. F.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **30**, 808 (1933). — J. Am. Med. Assoc. **104**, 2177 (1935). — [6] Harrop, G. A., L. J. Soffer, R. Ellsworth, H. J. Trescher: J. exper. Med. (Am.) **58**, 17 (1933). — [7] Verzár, F., u. L. Laszt: siehe Verzár, Die Funktion der NNrinde. Basel: Benno Schwabe 1939. — [8] Overton, E.: Pflügers Arch. **105**, 176 (1904). — [9] Locke, F. S.: J. Physiol. (Brit.) **32**, S. XXII (1905). — [10] Zwemer, R. L., u. R. C. Sullivan: Endocrinology (Am.) **18**, 97 (1934). — [11] Truszkowski, R., u. R. L. Zwemer: Biochem. J. (Brit.) **30**, 1345 (1936). — [12] Urechia, C. I., Gr. Benetato u. Retezeanu: C. r. Soc. Biol. **119**, 439 (1935). — [13] Marañon, G., u. J. A. Collazo: Klin. Wschr. **1935**, 1107. — [14] Helve, O. E.: Biochem. Z. **306**, 343 (1940). — [15] Fleckenstein, A.: Pflügers Arch. **246**, 411 (1942); **250**, 643 (1948). — Fleckenstein, A., u. H. Hertel: Pflügers Arch. **250**, 577 (1948). — [16] Ringer, S.: J. Physiol. (Brit.) **8**, 20 (1886). — [17] Mines, G. R.: J. Physiol. (Brit.) **37**, 408 (1908). — [18] Brock, N., H. Druckrey u. H. Herken: Biochem. Z. **302**, 393 (1939). — [19] Lundsgaard, E.: Biochem. Z. **217**, 162 (1930). — [20] Fleckenstein, A.: Verh. Physiol.-Kongreß 1949, Göttingen. — Fleckenstein, A., W. Brose, H. J. Canis, u. A. Förderer: Arch. exper. Path.

u. Pharmakol. (D.) im Druck. — [21] Winterstein, H.: Pflügers Arch. **120**, 225 (1907). — [22] Locke, F. S.: Zbl. Physiol. 1894, 166. — [23] Lucke, H., u. E. Heckmann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (D.) **189**, 87 (1938). — [24] Eichholtz, F., R. Hotovy, P. Collischonn, u. H. Knauer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (D.) **207**, 576 (1949). — [25] Neukamm, H.: Dissertation Heidelberg 1949. — [26] Eichholtz, F., R. Hotovy, u. H. Erdniss: Arch. internat. Pharmacodyn. **80**, 62 (1949). — [27] Hirase, K.: Pflügers Arch. **212**, 582 (1926). — [28] Ochoa, S.: Pflügers Arch. **231**, 222, (1933). — [29] Hastings, A. B., u. E. L. Compere: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med, (Am.) **28**, 376 (1931). — [30] Zwemer, R. L., u. R. Truszkowski: Science **83**, 558 (1936). — [31] Nilson, H. W.: Am. J. Physiol. **118**, 620 (1937). — [32] Rogoff, J. M., u. G. N. Stewart: Am. J. Physiol. **84**, 649 (1928). — [33] Banting, F. G., u. S. Gairns: Am. J. Physiol. **77**, 100 (1926). — [34] Marine, D., u. J. E. Baumann: Am. J. Physiol. **81**, 86 (1927). — [35] Corey, E. L.: Am. J. Physiol. **79**, 633 (1927). — [36] Swingle, W. W., J. J. Pfiffner, H. M. Vars, u. W. M. Parkins: Am. J. Physiol. **108**, 159 (1934). — [37] Rubin, M. J., u. E. T. Krick: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **31**, 228 (1933). — [38] Martin, St. J., u. J. F. Fazekas: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **37**, 369 (1937). — [39] Allers, W. D., u. F. C. Kendall: Am. J. Physiol. **118**, 87 (1937). — Kendall, F. C.: J. Am. Med. Assoc. **116**, 2394 (1941). — Endocrinology **30**, 853 (1942). — [40] Verzár, F.: Schweiz. med. Wschr. 1941, 1878; 1942, 661. — Vitamine u. Hormone **1**, 85 (1941). — Theorie d. Muskelkontraktion, Rectoratsprogramm. Univ. Basel 1942/43. — [41] Harrison, H. E., u. D. C. Darrow: Am. J. Physiol. **125**, 631 (1939). — [42] Darrow, D. C., H. E. Harrison, u. M. Taffel: J. Biol. Chem. **130**, 487 (1939). — [43] Wirz, H.: Helv. Physiol. Acta **3**, 589 (1945).

Dozent Dr. A. Fleckenstein, Heidelberg, Pharmakologisches Institut.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 236—246 (1950).

Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität Halle/Saale
(Direktor: Prof. M. Ratschow).

Veränderungen der Serumproteine nach Benzol- und Röntgenschädigung der Ratte.

Von

Rolf Emmrich und Karl Wandel.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 20. Oktober 1949.)

Klinische Forschung und Eiweißchemie befassen sich ausgiebig mit den Serumproteinen, deren pathophysiologische Veränderungen für viele Krankheiten kennzeichnend und auch pathogenetisch wichtig geworden sind. Die neuere Eiweißforschung hat Methoden entwickelt, die eine immer bessere Differenzierung der Serumproteine gestatten. Physikalische Methoden der Fraktionierung wie die Elektrophorese, aber auch feinere Fraktionierungen mit Hilfe der Alkohol- und Salzfällung, dazu kolloidchemische bzw. chemische Reaktionen, die zumeist mehr oder weniger ausgeprägte Abbaureaktionen nativer Proteine sind, stehen im Vordergrunde des Interesses. Es kommt darauf an, Mengenänderungen und Disproportionierungen noch normaler Serumproteine nachzuweisen, andererseits aber auch Dysproteine in den Serumproteinen zu erfassen.

Die Bildung der Albumine erfolgt nach heutiger Auffassung überwiegend in der Leber, die der Globuline im gesamten reticulo-endothelialen System. Störungen dieser Protopoese kennen wir bei verschiedenen Krankheiten wie bei Leberzirrhosen, Nephrosen, Paraproteinämien, aber auch bei Eiweißmangelschäden. Bei letzteren ist die Ursache dieser Störungen das quantitativ und qualitativ unzureichende Eiweiß in der Nahrung. Die Erforschung des Eiweißmangels hat eine Reihe neuer Erkenntnisse gebracht, unter denen der Nachweis von Serum-Dysproteinen pathophysiologisch wichtig erscheint (Herken und Remmer[1], Herken und Schunk[2], Emmrich[3]). Während über Serumproteine und Dysproteine immerhin einige gesicherte Befunde vorliegen, wissen wir über die Protopoese selbst, die im wesentlichen an eine Reihe fermentativer Leistungen gebunden ist, noch verhältnismäßig wenig. Die Synthese bestimmter Aminosäuren (der „nicht lebensnotwendigen"), Umaminierung, die Verknüpfung der Aminosäuren zu Polypeptidkomplexen sind nur einige dieser fermentativen Zellfunktionen.

Mehr Einblick als in die Protopoese haben wir in der Entstehung und Reifung der korpuskulären Blutelemente, allerdings fast nur in morphologischer Hinsicht, nicht in stofflicher. Man kann Schäden, welche die Leukopoese, Erythropoese und Thrombozytopoese treffen, hämatologisch verfolgen und sie an bestimmten Veränderungen erkennen. Wieweit Schädigungen des leuko- und erythropoetischen Systems auch die Protopoese in Mitleidenschaft ziehen und wie weit die entstandenen Veränderungen parallel verlaufen, ist noch kaum erforscht. Es ist auch nicht bekannt, wie weit Regulationen der Protopoese und damit der Plasmaproteine in Beziehung stehen zu Regulationen der Leuko- und Erythropoese, hier hat die klinische und die experimentelle Forschung noch ein weites Feld.

Hämatologische Studien haben gezeigt, daß der lipoidlösliche Kohlenwasserstoff Benzol und daß Röntgenstrahlen zu erheblichen Schäden in der Leuko- und Erythropoese führen. Santesson[4] beschrieb bereits um die Jahrhundertwende eingehend die Auswirkungen der Benzolintoxikation auf Knochenmark und die lymphatischen Organe, er arbeitete mit Kaninchen. Heinecke[5] befaßte sich mit der schädigenden Wirkung der Röntgenstrahlen auf die Leukopoese, zahlreiche Autoren führten diese Untersuchungen fort, so Heeren[6], Feller[7] u. a.

In eigenen Untersuchungen wurde unternommen zu klären, welche Schäden der Serum-Protopoese durch Benzol und Röntgenstrahlen entstehen bzw. welche Veränderungen der Serumproteine sich nachweisen lassen. Als Versuchstiere dienten Ratten, die nach Einwirkung von Benzol, das zusammen mit Öl wiederholt injiziert wurde und die in einer anderen Serie nach Einwirkung mehrerer Röntgen-Ganzbestrahlungen getötet wurden. Neben der Gewichtsbestimmung der Tiere, der Gewichtsbestimmung von Leber und Milz, wurde die Leukopoese verfolgt, die Serumproteine der Ratten wurden mit Ammonsulfat in steigenden Konzentrationen fraktioniert gefällt (Ammonsulfat-Trübungskurven) und es wurden im Serum klinische Eiweiß-Reaktionen angestellt.

Wenn es mit dieser Versuchsanordnung gelang, nach Benzol- und Röntgenschädigung Veränderungen der Serumproteine aufzufinden, so war von vornherein gewiß, daß damit die Frage, handelt es sich um unmittelbare Einwirkung auf das protopoetische System oder nur um sekundäre Folgen der Schädigung von Leuko- und Erythropoese, nicht eindeutig beantwortet werden konnte.

Zur Methodik.

Tierversuche: Es wurden insgesamt 50 ausgewachsene gesunde, fast ausschließlich männliche Ratten mit einem Durchschnittsgewicht von 250 g verwendet.

Reihe A. 12 Tiere waren normale Vergleichstiere. Sie wurden ohne Vorbehandlung in Äthernarkose dekapitiert. Bestimmt wurde das Gesamtgewicht, das Gewicht der Leber und der Milz. Das bei der Dekapitation aufgefangene Blut wurde sofort zentrifugiert, das Serum unmittelbar darnach verarbeitet.

Reihe B. 25 Tiere erhielten Benzol injiziert, täglich eine Injektion von ½—1 cm³ einer Mischung aus gleichen Teilen Mohnöl und Benzol unter die unvorbereitete Bauchhaut. Die Injektion von Reinbenzol wirkte zu toxisch, ein Teil der Tiere ging sofort nach der Injektion unter klonischen Krampferscheinungen ein, — auch bei Verwendung einer leichten Äthernarkose. Einige mit Benzol behandelte Tiere schieden wegen interkurrenter Pyodermien aus, andere gingen infolge der Benzolintoxikation ein, ohne daß von ihnen zuvor Serum gewonnen wurde. 12 Tiere genügten schließlich den Versuchsbedingungen.

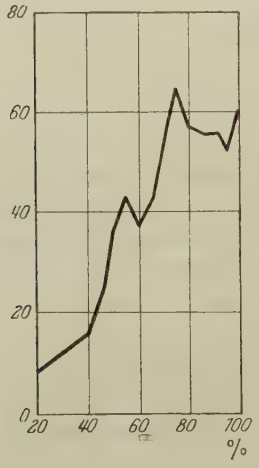


Abb. 1.

Normale Ammonsulfat-Trübungskurve

Reihe C. 13 Tiere wurden der Röntgen-Ganzbestrahlung unterworfen. Davon ging während der Bestrahlungsserie nur 1 Tier ohne ersichtlichen Grund ein.

Bestrahlung. Gerät: Siemens-Stabilivolt. Bestrahlungsdauer: ½—1 min 180 kv als Spitzenspannung. 8 mA. 0,5 mm Cu-Filter. Halbwertschicht 0,94 mm Cu. Fokusabstand 40 cm. Dabei wurde eine Strahlenintensität von 40 r/min erzielt.

Die in 3—4tägigen Abständen verabreichte Gesamtdosis bewegte sich zwischen 3 × 74 r als niedrigster und 14 × 74 r als höchster Dosis (Dosen im einzelnen siehe Tab. 3). Im übrigen wurde bei Reihe B und C verfahren wie unter A.

Untersuchungen der Leukopoese: Bei Versuchsreihe B und C wurden während der Benzol- bzw. Röntgenschädigung im Blute der Schwanzvene wiederholt die Leukozyten gezählt, in jedem Falle unmittelbar vor der Dekapitation. Zugleich wurde ein Blutausstrich angefertigt. Nach der Dekapitation wurde außerdem noch das Sternalmark ausgestrichen und untersucht.

Untersuchung an den Serumproteinen:

1. Bestimmung des Gesamt-Eiweißes im Serum: nach Kjeldahl,

2. fraktionierte Salzfällung: Benutzt wurde die von Schmitz und Wulkow[8] angegebene, später von Herken und Remmer[1] weiter durchgearbeitete Methode der fraktionierten Proteinfällung mit steigenden Ammonsulfat-Konzentrationen. Einheitliche Eiweißkörper werden dabei nicht gefällt, aber bei entsprechender Versuchsanordnung sind gut vergleichbare Trübungskurven zu erhalten. Quantitative Aussagen über den Anteil der einzelnen Proteinfraktionen kann man an Hand der Trübungskurven nicht machen, dagegen ermöglichen sie nach Herken und Remmer den Nachweis qualitativer Veränderungen, vor allem im Fällungsbereich der Albumine.

0,4 cm³ Serum gibt man zu 1,6 cm³ 0,9%iger NaCl-Lösung. Je 0,1 cm³ dieser Lösung werden in 15 Röhrchen einpipettiert, die je 10 cm³ einer Ammonsulfatlösung (puriss.) in steigenden Konzentrationen von 20—100% Sättigung enthalten. Endverdünnung 1 : 500. Nach 1stündigem Stehen bei Zimmertemperatur erfolgt die Messung der Trübwerte mit dem Zeiß-Trübungsmesser. p_H wird bei 6,0 gehalten.

3. Takata-Reaktion.

4. Biuret-Index. Wie früher angegeben[9]. Bestimmung des Serum-Ges.-Eiweißes erfolgt dabei mit der Kjeldahl-Methode.

Versuchsergebnisse.

Reihe A: *Normale Vergleichstiere.* Tab. 1 gibt einen Überblick über die erhaltenen Zahlenwerte. Es findet sich ein nahezu gleichbleibendes Verhältnis von Leber- und Milzgewicht zu dem Gesamtgewicht der Tiere. Die Leukozytenzahlen schwanken ganz erheblich, zwischen 6700 und 41000, liegen aber doch außer bei 2 Tieren immer über 10000. Die Werte für Gesamt-Eiw. im Serum bewegen sich zwischen 6,5 g% und 8,0 g%, Mittelwert 7,0 g%. Die Biuret-Indizes sind normal.

Tabelle 1. *Normale Tiere.*

Tier-Nr.	Gesamtgewicht g	Lebergewicht g	Lebergewicht zu Gesamtgewicht in %	Milzgewicht g	Milzgewicht zu Gesamtgewicht in %	Leukozyten	Serum Eiweiß g %	Biuret-Index
1	268	12,1	4,5	1,7	0,64	10700	7,0	70,0
2	281	10,9	3,9	1,2	0,43	17000	6,8	69,9
3	257	9,9	3,9	1,3	0,50	14200	7,3	71,7
4	265	10,2	3,9	1,2	0,45	17100	6,5	66,7
5	265	11,8	4,4	—	—	8400	7,4	—
6	244	7,8	3,2	0,9	0,37	41100	8,0	79,0
7	223	7,5	3,4	1,0	0,45	26800	6,7	70,1
8	296	12,3	4,2	1,3	0,44	32600	6,6	68,3
9	293	10,6	3,6	1,0	0,34	25100	6,6	67,9
10	214	8,0	3,7	1,2	0,56	14900	6,5	67,5
11	391	13,2	3,4	1,6	0,41	13800	7,6	76,0
12	232	8,2	3,5	0,7	0,30	6700	7,4	—
Durchschnittswert	269	10,2	3,8	1,2	0,38	19000	7,0	

Kurve A (Abb. 1) zeigt eine normale Ammonsulfat-Trübungskurve mit etwa dem gleichen Verlauf, wie ihn Herken und Remmer fanden. Es handelt sich bei der aufgezeichneten Kurve um Mittelwerte, die aus den wenig voneinander abweichenden Einzel-Trübwerten errechnet wurden. Das Maximum der Globulinfällung wurde bei 55% Ammonsulfat-Sättigung gefunden, das der Albuminfällung bei 75%.

Reihe B: *Mit Benzol behandelte Tiere.* Die Benzolgaben waren unterschiedlich, als geringste Dosis erhielt eine Ratte 4,2 cm^3/kg Körpergewicht, als höchste Dosis 45 cm^3/kg Körpergewicht. Es zeigte sich, daß das Gesamtgewicht der Tiere eine nur geringe Abnahme aufwies, das Lebergewicht im Durchschnitt dem Lebergewicht normaler Tiere entsprach, relativ jedoch etwas über dem %-Anteil der Normaltiere lag (Tab. 2).

Das Milzgewicht der mit Benzol geschädigten Tiere lag mit im Durchschnitt 0,8 g unter dem Normal-Durchschnitt von 1,2 g. Ebenso lag der prozentuale Milzanteil niedriger. Die Leukozyten betrugen weit weniger als normalerweise.

Die Bestimmung des Serum-Gesamt-Eiweißes zeigte eine Hypoproteinämie mäßigen Grades, im Durchschnitt 6,2 g% Gesamteiweiß gegenüber dem normalen Mittelwert von 7,0 g%. Die Biuret-Indizes hatten nur in den beiden Fällen B2 und B5 deutlich pathologische Werte (Tab. 2).

Die Ammonsulfat-Trübungskurven ließen in einigen Versuchen, so bei den Tieren B3 und B6, nur geringe Abweichungen erkennen, bei den meisten übrigen Tieren aber fanden sich deutliche Abweichungen der

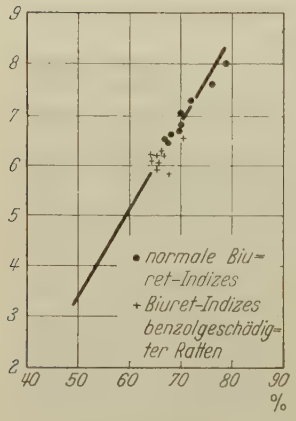


Abb. 2.

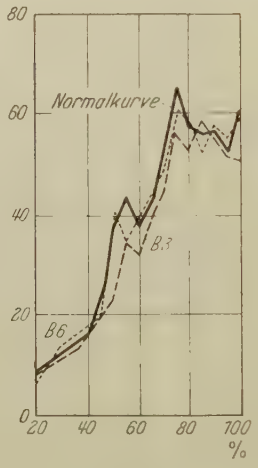


Abb. 3.

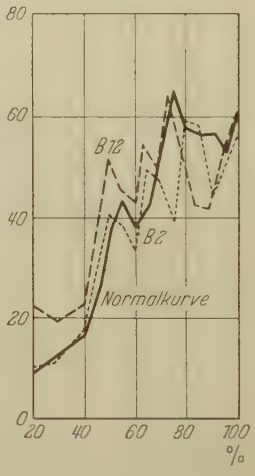


Abb. 4.

Kurven. Die Kurven B2 (zugleich pathol. Biuret-Index) und B12 (Hypoproteinämie von 5,85 g%) sind Beispiele dafür. Man findet eine Art „Kletterkurve", 2 Maxima der Trübwerte im Albuminbereich. Einen ähnlichen Befund mit einer „mittleren Albuminzacke" erhoben HERKEN und REMMER[1] bei hungerödemkranken Menschen. Die Albuminmaxima fanden wir vielfach erst bei höheren Ammonsulfatkonzentrationen als bei 75% Sättigung. Ein ganz einheitlicher Kurventyp konnte jedoch nicht herausgelesen werden. Dies liegt zum Teil daran, daß die Benzolmengen, die verabreicht wurden, unterschiedlich waren, daß wahrscheinlich auch die Resorption des Benzol nicht gleichmäßig erfolgte, und daß eine verschiedene Empfindlichkeit der Tiere gegen das schädigende Benzol anzunehmen ist.

Reihe C: *Röntgenbestrahlte Tiere.* Während in den Benzol-Versuchen die Tiere allgemeine Veränderungen zeigten wie Freßunlust, Epitheldefekte an den Ohren, struppiges Fell, Trägheit und Müdigkeit, hatten die röntgenbestrahlten Tiere auch nach hohen Röntgen-Dosen nur geringe derartige Erscheinungen. Das Gesamtgewicht blieb nahezu konstant

(Tab. 3), ebenso das Lebergewicht. Das Gewicht der Milz hingegen sank stark ab, es betrug im Mittel nur 0,67 g gegenüber 1,2 g bei normalen Tieren, in Beziehung zum Gesamtgewicht betrug es durchschnittlich 0,27% anstatt normal 0,38%. Die Leukozytenzahl war stark herabgemindert, sie überstieg in keinem Versuch die Zahl von 10000, die niedrigste Zahl lag bei 1300, Durchschnitt 4400 Leukozyten statt 19000 bei normalen Ratten.

Das Gesamt-Eiweiß im Serum war erniedrigt, im Mittel auf 6,0 g%. Während von den Benzoltieren 2 Tiere eine Hypoproteinämie unter 6,0 g% aufwiesen, hatten von den 12 röntgengeschädigten Tieren 5 Tiere weniger als 6 g% Gesamt-Eiweiß im Serum. Die Biuret-Indizes wichen bei mehr Tieren von den Normalwerten ab als bei den mit Benzol geschädigten Tieren. Als pathologisch zu bezeichnen sind die Biuret-Indizes bei den Tieren R3, R8, R9, R10, R11 und als fraglich pathologisch bei R2 und R7 (vgl. Tab. 3).

Fast alle Ammonsulfat-Trübungskurven ergaben Veränderungen, zumeist Verschiebungen der Fällungsmaxima, die häufig in

Tabelle 2. *Mit Benzol behandelte Tiere* (s. c. Injektionen in tägl. Folge).

Tier Nr.	Benzolgabe s. c. pro kg	Dauer der Behandlung	Gesamtgewicht g	Gewichtsänderung in %	Leber g	Lebergewicht zu Gesamtgewicht in %	Milz	Milzgewicht zu Gesamtgewicht in %	Leukozyten	Serum-Eiweiß g %	Biuret-Index
B 1	4,2 cm³	10 Tage	236	—	—	—	0,49	0,21	4000	6,23	64,2
B 2	8,5 cm³	9 Tage	334	—4,5	10,7	3,2	0,64	0,19	—	5,80	67,5
B 3	14,7 cm³	12 Tage	256	+8	11,4	4,5	1,20	0,47	9500	6,29	66,2
B 4	20,0 cm³	12 Tage	215	—14	9,2	4,3	0,95	0,44	9500	—	—
B 5	25,0 cm³	20 Tage	250	—10,7	10,5	4,2	0,85	0,34	17200	6,55	70,4
B 6	27,0 cm³	18 Tage	240	—9	11,0	4,6	1,19	0,50	19800	6,18	66,5
B 7	31,0 cm³	24 Tage	226	—9	12,7	5,6	0,68	0,3	8200	6,12	65,2
B 8	31,5 cm³	48 Tage	218	—9,6	11,6	5,3	0,57	0,26	—	6,21	64,6
B 9	31,5 cm³	18 Tage	219	—8,7	11,8	5,4	0,80	0,36	—	—	—
B 10	32,5 cm³	40 Tage	201	—	8,9	4,4	0,30	0,15	6600	6,19	64,1
B 11	35,7 cm³	14 Tage	219	—8,7	13,1	6,0	0,70	0,32	7200	6,35	—
B 12	45,0 cm³	51 Tage	232	—18,6	13,4	5,8	0,80	0,34	2800	5,85	65,0
Durchschnittswert			237	—8,5	11,3	4,8	0,8	0,32	9400	6,2	

3 oder 4 ansteigende Maxima aufgesplittert waren, also wieder einen Klettertyp darboten. Einzelne Kurven hatten auch eine Plateaubildung im Albuminbereich, nicht bei geringerer Röntgendosierung. Auch hier können nur wenige Beispiele gebracht werden, die als charakteristisch zu gelten haben. Die Kurven R3 und R4 lassen eine relativ hohe Globulinzacke erkennen und eine Aufsplitterung im Albuminfällungsbereich, bei höheren Ammonsulfatkonzentrationen einen stärkeren Wiederabfall. Die Kurven R7 und R8 zeigen recht gut den „Klettertyp", wiederum die auch bei den

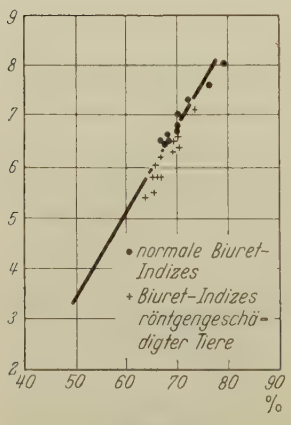


Abb. 5.

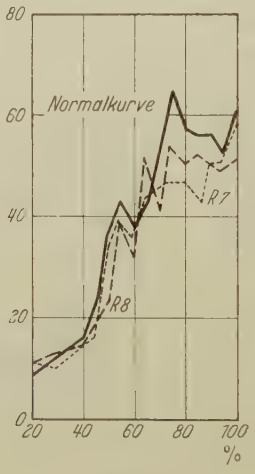


Abb. 6.

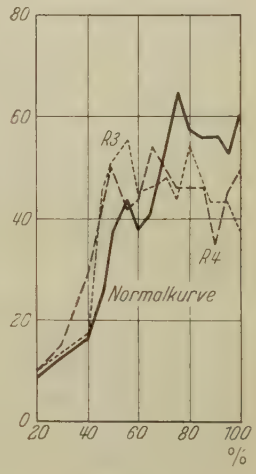


Abb. 7.

Benzoltieren beschriebene mittlere Zacke. Möglicherweise handelt es sich dabei um vermehrte α-Globuline, was jedoch mit Hilfe der elektrophoretischen Methode zu beweisen wäre.

Die Takata-Reaktion ergab bei keinem Tier Flockungen, sondern nur Trübungen. Normaltiere und mit Benzol gespritzte Tiere wiesen im 5. bis 8. Röhrchen Trübungen auf, unter den röntgenbestrahlten Ratten hatten R4, R11 und R12 bereits im 4. Röhrchen Trübungen, was als Zeichen einer geringeren Kolloidstabilität zu gelten hat.

Die Blutausstriche ergaben bei benzol- und röntgen-geschädigten Tieren eine Zunahme der Lymphoyzytenzahlen, ganz vereinzelt nur eine Abnahme, die Zunahme ist nur relativ, da die Leukozytenzahlen im ganzen und vorwiegend die Granulozyten absanken. Der Sternalausstrich deckte nur geringfügige Veränderungen auf, keine Hypoplasie des Knochenmarkes, eher eine gesteigerte Regeneration. Dazu fanden sich sowohl bei benzol- als auch bei röntgen-geschädigten Tieren im Knochenmark weniger Eosinophile als bei Normaltieren, mehr Megakariozyten als normalerweise und Frühformen einer stärkeren plasmazellulären Umwandlung.

Tabelle 3. *Röntgenbestrahlte Tiere.*

Tier-Nr.	Zahl der Ganzbestrahlung in 3—4tägig. Abständen	Gesamtgewicht g	Gewichtsveränderung in %	Lebergewicht g	Lebergewicht zu Gesamtgewicht in %	Milzgewicht g	Milzgewicht zu Gesamtgewicht in %	Leukozyten Anzahl	Serum Eiweiß g %	Biuret-Index
R 1	1×37 r 3×74 r	217	—10	8,3	3,8	0,55	0,25	4900	7,14	72,8
R 2	1×37 r 4×74 r	312	+2	11,26	3,6	0,85	0,27	7200	5,78	65,0
R 3	1×37 r 6×74 r	275	+5	9,6	3,5	0,52	0,19	2600	5,39	63,4
R 4	1×37 r 7×74 r	293	+4,5	10,15	3,5	0,84	0,29	9500	6,05	65,1
R 5	9×74 r	295	+31,7	12,10	4,1	0,72	0,24	—	6,24	66,3
R 6	10×74 r	285	—	10,27	3,6	0,52	0,18	—	6,58	70,0
R 7	10×74 r 1×110 r	178	—14,5	7,86	4,4	0,38	0,21	4400	5,78	65,0
R 8	10×74 r 1×110 r	213	—14,0	8,56	4,0	0,94	0,44	2500	5,51	64,9
R 9	10×74 r 1×110 r	225	—18,7	9,87	4,4	0,59	0,26	7400	6,43	69,9
R 10	10×74 r 1×110 r 1×148 r	267	—4,0	9,81	3,7	0,65	0,24	1300	6,32	68,8
R 11	10×74 r 1×110 r 1×148 r	253	—4,5	10,59	4,2	0,62	0,24	3200	5,79	65,8
R 12	10×74 r 1×110 r 1×148 r	318	—4,8	13,9	4,4	0,86	0,27	1900	6,55	69,0
Durchschnittswert		261	—2,3	10,2	3,9	0,67	0,26	4400	6,0	

Besprechung der Ergebnisse.

In den beschriebenen Versuchen wurden gesunde Ratten mit Benzol und mit Röntgenstrahlen geschädigt, mit Noxen, von denen man weiß, daß sie Leukopoese und Erythropoese schädigen. Geschädigt werden in erster Linie das Knochenmark, die Milz, die lymphatischen Organe. Wallbach[10] fand nach Benzol bei Hunden und Kaninchen eine Leukopenie, nicht bei Meerschweinchen, Mäusen und Hühnern, Feller[7] wies in seinen Versuchen mit Benzol eine deutliche Leukopenie auch bei Ratten nach. Die Leukopenie nach Röntgenbestrahlung des Menschen, insbesondere nach Tumorbestrahlungen ist bekannt und beschrieben (Bosch[11] u. a.).

Der leukopenische Effekt des Benzols und der Röntgenstrahlen ist in unseren Versuchen durchweg vorhanden, es konnte angenommen werden, daß die Leukopoese geschädigt war. Über die Erythropoese haben wir Untersuchungen nicht angestellt.

Die Schädigungen durch Röntgen-Ganzbestrahlungen waren schwerwiegender als die durch Benzol-Injektionen, wobei allerdings die Dosierung eine Rolle spielt und die individuelle Empfänglichkeit der Tiere. Beide Versuchsreihen sind in ihren Ergebnissen deshalb nur qualitativ, nicht quantitativ miteinander zu vergleichen. Immerhin ist bemerkenswert, daß sich die röntgenbestrahlten Tiere in ihrem Allgemeinbefinden weniger geschädigt erwiesen als die Benzoltiere, obwohl die Röntgenbestrahlung zu stärkeren Veränderungen der Leukozyten und der Serumproteine führte.

Die Serumproteine zeigten unter der Einwirkung von Benzol und von Röntgenstrahlen folgende Veränderungen:

1. eine Hypoproteinämie, die nicht hochgradig, aber doch eindeutig nachzuweisen war. In vielen Fällen unterschritt sie die 6 g%-Grenze;

2. in den Ammonsulfat-Trübungskurven fanden sich, fast parallel verlaufend zur Hypoproteinämie und zur Leukopenie, Änderungen im Kurvenverlauf, Verschiebungen der Trübwert-Maxima für Globuline und für Albumine mit vielfach einem weiteren Maximum zwischen 55%iger und 75%iger Ammonsulfat-Sättigung. Einen ähnlichen Kurvenverlauf fanden Herken und Remmer[1] in ihren Fällen von Hungerödemen des Menschen, nur war in diesen Kurven die Albuminzacke im ganzen niedriger;

3. Abweichungen der Biuret-Indizes sind bei den röntgen-bestrahlten Tieren häufig anzutreffen, bei den mit Benzol geschädigten Tieren nur vereinzelt. Pathologische Biuret-Indizes sind der Ausdruck für eine Änderung in der Bildung von Cu-Protein-Komplexen[9];

4. in der Takata-Reaktion sind Flockungen bei keinem Serum nachzuweisen. Es kann daher eine nennenswerte absolute oder relative Vermehrung der Globuline, vor allem der γ-Globuline nicht bestehen. Das

Überwiegen der grobdispersen Phase müßte in einem oder mehreren Röhrchen Flockungen hervorrufen. Möglich ist allerdings, daß die α-Globuline vermehrt sind.

Zusammenfassend ist zu den Veränderungen der Serumproteine zu sagen, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen vorwiegend die Albumine von der Norm abweichende Eigenschaften aufwiesen, weniger die Globuline. Ob die gefundenen Veränderungen allein auf eine Disproportionierung normaler Albumin-Unterfraktionen und möglicherweise auch normaler Globulinfraktionen (Vermehrung leichter löslicher Globuline) zurückzuführen sind, oder auf neuentstandene Dysproteine, kann noch nicht sicher entschieden werden. Wahrscheinlich liegen in ihren Makrostrukturen andersartige Dysproteine vor. Herken und Remmer deuteten ihre Ammonsulfat-Trübungskurven beim Hungerödem im Sinne einer Dysprotie. Ebenso nehmen wir an, daß pathologische Biuret-Indizes eine Dysprotie beweisen.

Auffällig ist nun, daß Ammonsulfat-Trübungskurven, pathologische Biuret-Indizes und Hypoproteinämien nach Benzol- und Röntgenschädigung in ganz ähnlicher Weise gefunden werden wie bei Eiweißmangel- (Hunger-) Schäden. Eiweißarm ernährte Ratten zeigten in eigenen Versuchen den Benzol- und Röntgenschädigungen verwandte Ammonsulfat-Trübungskurven, wir werden in anderem Zusammenhange darüber näher berichten. Diese Tiere hatten aber im Gegensatz zu den mit Benzol und Röntgenstrahlen geschädigten eine starke Gewichtsabnahme, auch eine starke Verringerung des Lebergewichtes. Man kann diese Befunde nur so deuten, daß verschiedene Noxen wie Benzol, Röntgenstrahlen, das Fehlen lebenswichtiger Aminosäuren in der Protopoese, vorwiegend in der Albuminpoese zu Störungen führen, die einem einheitlichen charakteristischen Reaktionstyp des Organismus entsprechen. Das besagt aber nicht, daß dabei auftretende Dysproteine dieselben sind, sie können trotz eines einheitlich erscheinenden Reaktionstypes noch verschieden sein.

Wie eingangs erwähnt, ist mit unserer Versuchsanordnung nicht zu entscheiden, ob die Benzol- und Röntgenschädigung primär die Serum-Protopoese trifft, oder ob die Proteinveränderungen im Serum nur Folgeerscheinungen sind, also Reaktionen auf andere Zellschädigungen. Man kennt die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit von gesunden Körpergeweben. Am empfindlichsten sind Lymphgewebe, Knochenmark, Thymus, dann Ovarien, Hoden und andere Gewebe, während die Leber — Albuminbildner — anscheinend weit weniger strahlenempfindlich ist. Die Folge der Strahlenschädigungen sind degenerative Erscheinungen an den Zellen mit Funktionsausfällen, bekannt ist die Störung der prämitotischen Phase und des damit zusammenhängenden Aufbaustoffwechsels der Zelle. Gewissermaßen als Reaktion auf diese regressiven Veränderungen kann es zu sekundären Störungen in der Serum-Eiweiß-Bildung

kommen, oder aber die morphologisch sich nicht abzeichnenden Zellen der Albuminpoese — nach heutiger Auffassung die Leberparenchymzellen — sind ähnlich strahlenempfindlich wie das leukopoetische System.

Mit unseren Versuchen an Ratten ist nachgewiesen, daß sowohl die Benzol-Intoxikation als auch die Röntgen-Ganzbestrahlung zu pathophysiologischen Veränderungen der Serumproteine führen, die auf die Protopoese zu beziehen sind. Auf die Protopoese sind sie deshalb zu beziehen, weil Hypoproteinämien zu beobachten sind, die durch eine unmittelbare Einwirkung von Benzol oder Röntgenstrahlen auf das Serum, bzw. die Serumproteine nicht zu erklären sind. Man könnte allenfalls daran denken, daß es am Orte der Schädigung zu einem erhöhten Albuminbedarf kommt, damit verbunden zu einem gesteigerten Albuminverlust aus dem Plasma. Aber hierfür liegen keinerlei Befunde vor, ein allgemeines oder ein lokales Ödem der Tiere wurde nicht bemerkt.

Zusammenfassung.

An normalen Ratten, benzol- und röntgengeschädigten Ratten wurden bestimmt: das Gesamt-Gewicht, Leber- und Milz-Gewicht, die Leukozyten, das Gesamt-Eiweiß im Serum, der Biuret-Index, die Takata-Reaktion, und es wurden Ammonsulfat-Trübungskurven angelegt.

Dabei zeigte sich, daß Benzol- und Röntgen-Schädigung zu geringfügigen Änderungen des Gesamt-Gewichtes und des Lebergewichtes führen, dagegen zu stärkerem Absinken des Milzgewichtes und zur Leukopenie. Bei mit Benzol geschädigten Tieren und auch bei röntgenbestrahlten Tieren kam es zu Hypoproteinämien, zu charakteristischen Änderungen der Ammonsulfat-Trübungskurven und besonders bei den röntgengeschädigten Tieren vielfach zu Abweichungen der Biuret-Indizes. Die Takata-Reaktion blieb immer negativ.

Die gefundenen Änderungen der Serumproteine werden auf pathophysiologische Störungen der Serum-Protopoese bezogen, besonders der Albuminpoese, da die Änderungen der Serumproteine vorwiegend den Albuminbereich betrafen.

Literatur.

[1] Herken, H., u. H. Remmer: D. Dtsch. Gesdh.wes. **1946**, 683. — Klin. Wschr. **1947**, 469. — [2] Herken, H., u. J. Schunk: Z. ges. inn. Med. **1948**, 729. — [3] Emmrich, R.: Z. ges. inn. Med. **1948**, 312; **1949**, 178. — [4] Santesson, C. G.: Arch. f. Hyg. **31**, 336 (1879). — [5] Heinecke, H.: Mitt. Grenzgeb. d. Med. u. Chir. **14**, 21 (1905). — [6] Heeren, J. G.: Strahlenther. **56**, 88 (1936). — Heeren, J. G., u. Senkerling: Strahlenther. **67**, 130 (1940). — [7] Feller, A.: Strahlenther. **60**, 393 (1937). — [8] Schmitz, A., u. F. Wulkow: Biochem. Z. **205**, 408 (1932). — [9] Emmrich, R.: Z. ges. inn. Med. **1949**, 178. — [10] Wallbach, G.: Z. exper. Med. **87**, 340 (1933). — Strahlenther. **46**, 675 (1933). — Fol. hämat. (Lpz.) **43**, 340 (1931). — [11] Bosch, H.: Strahlenther. **45**, 503 (1932).

Doz. Dr. Rolf Emmrich, Halle/Saale, II. Med. Univ.-Klinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 247—256 (1950).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Hamburg
(Direktor: Prof. Dr. Ed. Keeser).

Zur Pharmakologie des Cers.

(Wirkung auf das Blutbild von Kaninchen.)

Von

Fr. Meyer.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 17. November 1949.)

Der Atombau des Cers ist wie der aller Elemente der Lanthanidengruppe durch den Ausbau von 4_4-Bahnen charakterisiert (Remy[1]). Die Sonderstellung im Periodischen System der Elemente sowie die relativ geringe Toxizität des Cers sind wohl ein Teil der Gründe dafür gewesen, daß es schon häufig in der Human- und auch in der Veterinärmedizin eine gewisse, meist zweifelhafte Rolle gespielt hat[2–10]. Neuerdings wird dem Cer von einigen praktischen Ärzten eine günstige Wirkung bei Anämien verschiedener Genese nachgesagt. Die diesbezügliche Literatur vermittelt kein eindeutiges Bild. So fand Mori[11] nach einer vorübergehenden Leukopenie eine Leukozytose. Die Zahl der Erythrozyten war nach mittleren Dosen vermindert[11a]. Hara[12] konnte nach 3maliger subkutaner Injektion von 1 g Cerchlorid keine auffallende Veränderung des Blutbefundes beobachten (nähere Einzelheiten sind nicht angegeben). Eine Abnahme des Hämoglobingehaltes nach intravenöser Injektion von Cer beschrieben Maxwell und Bischoff[10]. Im Rahmen ihrer umfangreichen Untersuchungen über die gerinnungshemmende Wirkung der Lanthanide stellten Oelkers und Vincke[13] unter anderem auch fest, daß Cer weder bei einmaliger noch bei chronischer Verabfolgung (intravenös, subkutan oder peroral) das Blutbild über die Grenze des Normalen hinaus verändert. Untersuchungen über Veränderungen des Blutbefundes nach Verabfolgung anderer Seltenerden liegen vor von Guidi[14] (Nd) und Niccolini[15] (Pr, Sm). Nach diesen Autoren nehmen die Zahl der Erythrozyten sowie der Hämoglobingehalt bei gleichbleibendem Färbeindex ab. Im Gegensatz hierzu fanden Grenet und Drouin[16] eine Vermehrung der Erythrozyten und eine erhebliche Leukozytose nach Lanthan-, Neodym-, Praseodym- und Samariumgaben. Steidle[17] referiert außerdem das Auftreten von Erythroblasten und anderen Vorstufen der Erythrozyten im peripheren Blut, die auf eine Beeinflussung des Knochenmarks hinweisen sollen. Diesen zum großen Teil einander widersprechenden Befunden ist unseres

Erachtens eine nur geringe Beweiskraft beizumessen, weil sie alle an einem nach den heute gültigen Anforderungen viel zu kleinen Tiermaterial (zum Teil 1 Tier) erhoben wurden. Außerdem blieb in allen Fällen die Fehlerbreite der einzelnen Bestimmungsmethoden unberücksichtigt. Diese Tatsache allein kann einen Teil der Widersprüche dahingehend erklären, daß die beobachteten Veränderungen größtenteils innerhalb der Fehlerbreite der Methode liegen. Darüber hinaus bleibt aber die Frage offen, ob das Cer nicht einen fördernden Einfluß auf die Heilung von Anämien haben kann.

Wir haben daher versucht, den Einfluß des Cers auf das Blutbild normaler Kaninchen und in einer 2. Versuchsreihe die Cerwirkung auf die normale Regeneration nach einer Entblutungsanämie experimentell zu prüfen.

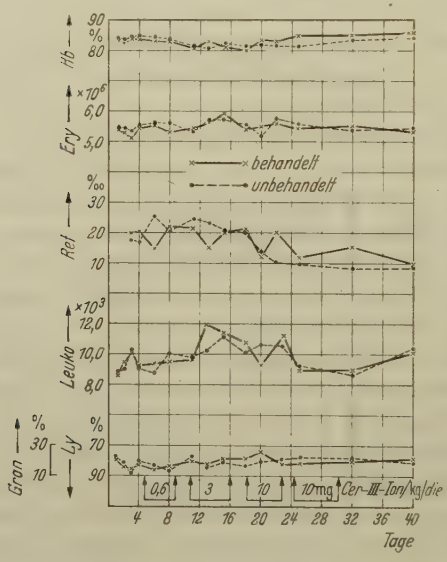


Abb. 1. Die Hämoglobinwerte (Hb) sind in % angegeben, die Erythrozytenwerte (Ery) in Mill./mm³, die Retikulozyten (Ret) pro 1000 Erythrozyten, die Leukozyten (Leuko) in 10^3/mm³, und das Verhältnis der Granulozyten (Gran) zu den Lymphozyten (Ly) in % (Differenzierung von 100 Zellen pro Ausstrichpräparat).

Experimenteller Teil.

Von 10 normalen Kaninchen, die bei einer Raumtemperatur von 18—23° C in Einzelkäfigen gehalten wurden, wurden 5 Tiere täglich mit Cer behandelt. Vom 5.—9. Tag erhielten diese 0,6 mg, vom 11.—16. Tag 3 mg, vom 18.—23. Tag und vom 25.—30. Tag jeweils 10 mg Cer-III-Ion pro kg Körpergewicht subkutan injiziert, wobei eine isotonische Cer-III-chlorid-Lösung verwendet wurde. Die übrigen Versuchsbedingungen wurden für alle Tiere so konstant wie möglich gehalten. Von Zeit zu Zeit wurde außerdem die Körpertemperatur der Tiere gemessen, ohne daß hierbei nennenswerte Schwankungen beobachtet wurden. Von den 5 mit Cer behandelten Tieren und den 5 Kontrolltieren wurden im Abstand von 2 bzw. 3 Tagen je 1 vollständiges Blutbild angefertigt, wobei wir uns der üblichen Routinemethoden bedienten*.

Die Hämoglobinbestimmung erfolgte nach Sahli; Erythrozyten und Leukozyten wurden nach entsprechender Verdünnung in geeichten Mischpipetten in einer Thoma-Zeiß-Kammer ausgezählt, die einzelnen Leukozytenformen in einem nach Pappenheim gefärbten Ausstrichpräparat (Objektträgermethode) differenziert. Die Retikulozytenzählung erfolgte nach einer von Oortgiese[18] angegebenen

* Es ist mir eine angenehme Pflicht, auch an dieser Stelle Frau S. G. Grube für die freundliche Hilfe bei der umfangreichen Zählarbeit meinen Dank auszusprechen.

Methode. Auf eine Differenzierung der Retikulozyten nach HEILMEYER und TRACHTENBERG[19] wurde verzichtet, weil wir darin keinen grundsätzlichen Vorteil sehen.

In der Abb. 1 findet sich das Ergebnis der 1. Versuchsreihe: die Cerwirkung auf das Blutbild normaler Kaninchen graphisch dargestellt. Die einzelnen Punkte der Kurve sind die aus je 5 Einzelwerten errechneten Mittelwerte (arithmetische Mittel); sie sind im Falle der 5 behandelten Tiere durch eine ausgezogene, im Falle der 5 Kontrolltiere durch eine gestrichelte Linie miteinander verbunden.

Schon bei oberflächlicher Betrachtung der Hämoglobin-, der Erythrozyten-, der Granulozyten- und der Lymphozytenwerte fällt der verhältnismäßig gleichförmige Verlauf der Kurve auf. Etwas mehr Schwankungen zeigt die Kurve der Leukozyten- und die der Retikulozytenwerte.

Aus keiner der Kurven läßt sich ein deutlicher Einfluß des Cers ablesen. Sie überkreuzen sich unabhängig von der Behandlung und unabhängig von der den ersten 5 Tieren verabfolgten Cer-Dosis. Über die Retikulozyten könnte man vielleicht sagen, daß die Werte für die behandelten Tiere in den ersten 14 Tagen gegenüber denen der Kontrollen etwas vermindert und vom 20.—32. Tag — nach Erhöhung der Dosis auf 10 mg/kg — ein wenig vermehrt sind.

Die nach eingeführten Methoden angestellte statistische Behandlung der hier zu prüfenden Frage ergab jedoch, daß ein Einfluß des Cers auf das Blutbild normaler Kaninchen mit ziemlicher Sicherheit abzulehnen ist. So ließ sich nach der Formel $k = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{\varepsilon_1^2 + \varepsilon_2^2}}$ in keinem Falle aus zwei einander entsprechenden Mittelwerten eine signifikante Differenz errechnen. Weiterhin wurden die Gesamtstreuung der beobachteten Schwankungen berechnet nach der Formel $\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma a^2}{n-1}}$ und die erhaltenen Werte mit der von uns[28] kürzlich mitgeteilten Streuung der Methodik verglichen.

Tabelle 1. *Streuungen* (mittl. Abw. d. Einzelbeobacht. vom Mittelwert).

	Behandelte Tiere	Unbehandelte Tiere	Streuung der Methode[28]
Hämoglobin (%)	3,4	4	4
Erythrozyten (10^6)	0,4	0,4	0,4
Retikulozyten (‰) . . .	7	8	6
Leukozyten (10^3)	1,5	1,9	1,6
Granulozyten (%)	6	6	5
Lymphozyten (%)	6	6	5

Tab 1 zeigt, daß die für beide Tiergruppen errechneten σ-Werte alle in der gleichen Größenordnung liegen wie die der Methode. Darüber hinaus ist die mittlere Abweichung der unbehandelten Tiere meist größer als die der behandelten. Die aufgetretenen Schwankungen können ohne weiteres durch die Fehlerbreite der Bestimmungsmethoden erklärt werden.

Wir sind daher in Übereinstimmung mit Vincke und Oelckers (a. a. O.) der Meinung, daß das Cer keinen nennenswerten Einfluß auf das periphere Blutbild normaler Kaninchen hat.

Zur Prüfung der Frage, ob das Cer eine günstige Wirkung auf Anämien hat, haben wir die Regeneration nach einer Entblutungsanämie von 4 unbehandelten Kontrolltieren verglichen mit 4 Tieren, denen in den ersten 7 Tagen 2 mg und vom 8.—21. Tag 10 mg Cer-III-Ion/kg Körpergewicht täglich intramuskulär injiziert wurde. Die Entblutung der Tiere erfolgte in 3 Tagesportionen von je 20—30 cm³ Blut. Bei diesem Vorgehen konnten Kollapserscheinungen vermieden werden, so daß das erhaltene Bild einer normalen und spontanen Regeneration außer durch Cer-Gaben von keinen therapeutischen Maßnahmen beeinflußt wurde. Insgesamt wurden 65—80 cm³ Blut pro Tier aus der Ohrvene entnommen. Diese Menge mußte etwas variiert werden, um die einzelnen Ausgangswerte einander anzugleichen. Letztere lagen zwischen 35 und 40% Hämoglobin sowie zwischen 3 und 3,4 Mill. Erythrozyten/mm³.

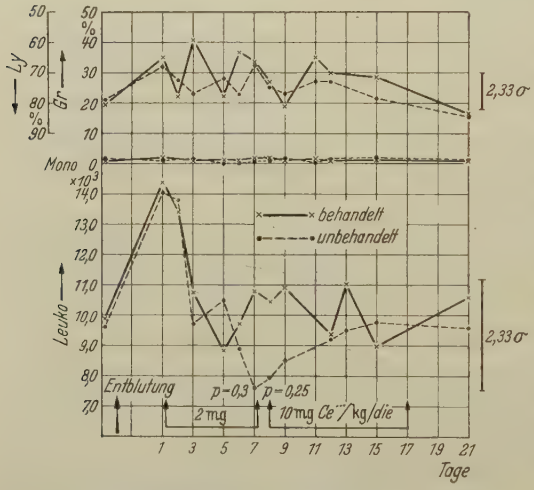


Abb. 2. Weißes Blutbild (Entblutungsanämie). Die Leukozytengesamtzahl (Leuko) ist in 10^3/mm³ angegeben; die Granulozyten (Gr), Lymphozyten (Ly) und Monozyten (Mono) in % beziehen sich auf 100 differenzierte Zellen pro Ausstrich.

Die tägliche Blutbildkontrolle hatte das in den Abb. 2 und 3 dargestellte Ergebnis. Die einzelnen Punkte der Kurven geben den Mittelwert aus 4 Einzelbeobachtungen wieder.

Das weiße Blutbild (Abb. 2) zeigte während der ganzen Versuchsdauer außer einer zu Beginn beobachteten Reizleukozytose (Wirth[20]) keine Besonderheiten. Eine Cer-Wirkung ist nicht zu erkennen. Die relativ großen Schwankungen der Leukozytenzahl und der im Ausstrichpräparat differenzierten Leukozytenformen sind auf die Fehlerbreite der Bestimmungsmethoden zu beziehen (siehe Tab. 1).

Grundsätzlich anders liegen die Verhältnisse bei dem roten Blutbild (Abb. 3). Vom 2. Tage an liegen die Mittelwerte für die unbehandelten Tiere deutlich über denjenigen der behandelten Tiere, so daß eine Hemmung der Regeneration durch Cer zu resultieren scheint statt der eigent-

lich erwarteten Förderung. Die Hämoglobin- und Erythrozytenkurve der behandelten Tiere erfahren nach dem 8. Tage (5fache Dosis) keine Richtungsänderung — weder in sich noch in bezug auf die Kurve der Kontrolltiere, so daß die Hemmung unabhängig von der verabfolgten Dosis zu sein scheint. Das von uns beobachtete Maximum der Retikulozytenzahl (Abb. 3) entspricht dem von Wolf, Tschesche, Kröger und Wolf[21] gefundenen Wert von 140‰ nach einer Erythrozytenverminderung auf 2,8 Millionen pro mm³. Die zeitliche Dauer der „Retikulozytenkrise" war bei unseren Untersuchungen unabhängig von der Cerbehandlung. In der 2. Woche wurden die Werte der behandelten Tiere den Werten der Kontrolltiere nahezu gleich. In der 1. Woche dagegen lag das Maximum der Retikulozytenzahl pro 1000 Erythrozyten bei den unbehandelten Tieren (143‰) um 30‰ höher (und wurde etwas schneller überschritten) als bei den behandelten Tieren (113‰). Nach allgemeiner Ansicht ist aber dieses Maximum u. a. abhängig vom Grad der Anämie. Der um 0,4 Mill./mm³ niedrigere Ausgangswert der Erythrozyten bei den unbehandelten Tieren könnte daher möglicherweise das um 30‰ höhere Maximum der Retikulozyten auch ohne einen hemmenden Einfluß des Cers erklären.

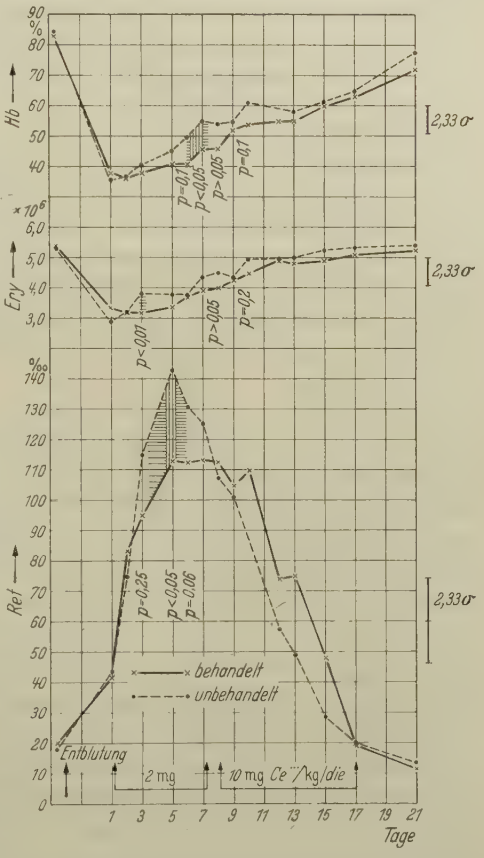


Abb. 3. Rotes Blutbild (Entblutungsanämie). Hämoglobingehalt (Hb) in %, Erythrozytenzahl (Ery) in 10^6/mm³, Retikulozyten (Ret) pro 1000 gez. Erythrozyten.

Immerhin läßt sich nach diesen Versuchen eine fördernde Wirkung des Cers auf die Regeneration einer Entblutungsanämie mit Sicherheit ausschließen. Die Frage aber, ob das Cer eine hemmende Wirkung auf die Erythropoese hat, wie sie beispielsweise für das Colchicin von Dustin[22] beschrieben wurde, bleibt zunächst noch offen. Die Differenz zwischen

den das rote Blutbild betreffenden Kurvenpaaren scheint dafür zu sprechen.

Wir haben daher versucht, dem Problem auf mathematischem Wege näher zu kommen Für den Fall einer statistisch wahrscheinlichen* Hemmung der Erythropoese wäre zu fordern, daß die Differenz zwischen 2 einander entsprechenden Mittelwerten (Kurvenpunkten)

1. keine zufällige ist und
2. außerhalb der Fehlerbreite der Methode liegt.

Zu 1. Für die Differenzberechnung benutzten wir die allgemein anerkannte Formel $k = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{\varepsilon_1^2 + \varepsilon_2^2}}$

Der für k errechnete Zahlenwert gestattet, den entsprechenden p-Wert [Wahrscheinlichkeit der Signifikanz $= (1 - p) \cdot 100\%$] in der Tabelle nach R. A Fisher[23], die auch bei Burn[24], Ther[25], Weber[26] u. a abgedruckt ist, direkt abzulesen. Ein p-Wert von 0,05 ist im allgemeinen die Minimalforderung entsprechend der 2σ-Regel. Fisher (a. a. O.) hält entsprechend seiner $2{,}33\,\sigma$-Regel erst einen p-Wert von 0,02 für ausreichend. Der $3\,\sigma$-Regel würde $p = 0{,}01$ entsprechen. Die auf diese Weise für je 2 Punkte der Kurven errechneten p-Werte sind in den Abb. 2 und 3 angegeben.

Zu 2. Den in die obige Formel eingesetzten mittleren Fehlern des Mittelwertes (ε) liegt aber eine verhältnismäßig sehr kleine Zahl von Einzelbeobachtungen zugrunde: pro ε nur 4 Bestimmungen. Diese können zufällig so gut übereinstimmen, daß daraus unverhältnismäßig kleine Werte resultieren, die einerseits der Fehlerbreite der Bestimmungsmethoden widersprechen und andererseits im Nenner obiger Gleichung einen zu großen k-Wert zur Folge haben. Wir sehen in dieser Möglichkeit die große Gefahr, zu „statistisch gesicherten" Trugschlüssen zu kommen, wie wir bereits an anderer Stelle[28] mit einem Beispiel belegt haben. Aus diesem Grunde wurde außerdem die Streuung der Methode (siehe Tab. 1) in den Kurven der Abb. 3 als Strecke dargestellt.

Der Abstand zwischen den beiden Hb-Kurven wird am 7. Tag, der der beiden Retikulozytenkurven am 5. Tag ein wenig größer als die doppelte Streuung der Methode (senkrecht gestrichelt). Zu beiden Seiten ist diese Fläche flankiert von einer waagerecht gestrichelten, die andeuten soll, wo die Differenz zwischen den Kurvenpaaren mit 95% Wahrscheinlichkeit signifikant ist ($p = 0{,}05$).

Wenn wir auch unsere mit relativ ungenauen Methoden an einer kleinen Anzahl von Versuchstieren erhobenen Befunde wenigstens zum großen Teil durch eine große Anzahl von Einzelbeobachtungen (tägl.

* Den Ausdruck „statistisch gesichert" durch den Ausdruck „statistisch wahrscheinlich" zu ersetzen, haben kürzlich Wigand, Herrnring und Soehring[27] vorgeschlagen.

Blutstatus) ausgeglichen haben, so halten wir die von FISHER (a. a. O.) geforderte 2,33 σ-Grenze ($p = 0{,}02$) für das absolute Minimum der Signifikanz. Die Differenz der betrachteten Kurvenpaare wird aber an keiner Stelle so groß, daß diese Forderung erfüllt wird. Eine Hemmung der Erythropoese durch Cer läßt sich mit statistischen Hilfsmitteln *nicht* wahrscheinlich machen. Wir müssen daher die beobachtete „Hemmung" als Zufallsbefund auffassen, der mit einer Cerwirkung nichts zu tun haben muß. Ein weiterer Zufallsbefund ist das Ergebnis der Erythrozytenzählung am 3. Tag (Abb. 3 und Tab. 2).

Tabelle 2. Erythrozytenzählung am 3. Tag.

	Behandelte Tiere	d^2	Unbehandelte Tiere	d^2
	2,94	0,0324	3,69	0,0016
	2,96	0,0256	3,56	0,0289
	3,30	0,0324	3,88	0,0225
	3,28	0,0256	3,77	0,0016
M	3,12		3,73	
Σd^2		0,116		0,0546
σ	0,2		0,14	
ε	0,1		0,07	

$$k = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{\varepsilon_1^2 + \varepsilon_2^2}} = 5{,}2 \text{ folglich wird } p < 0{,}01$$

Wie aus Tab. 2 zu ersehen ist, stimmen die Werte der Einzelbeobachtungen unwahrscheinlich gut überein. Diese gestatten, eine im Sinne der 3 σ-Regel „*sicher*" signifikante Differenz der Mittelwerte zu errechnen (im englischen und amerikanischen Schrifttum: high significant). Eine solche Schlußfolgerung wäre aber ein Irrtum, denn die Differenz der Mittelwerte ist nur an diesem einen Tag „signifikant". Der weitere Verlauf des Kurvenpaares zeigt deutlich, daß sich die Werte der behandelten Tiere trotz forgesetzter Cergaben denen der Kontrolltiere nähern. Darüber hinaus wird die Fehlerbreite der Methode nicht überschritten ($M_1 - M_2 = 0{,}61 < 0{,}92 = 2{,}33\ \sigma$). Dieses Beispiel zeigt deutlich die Gefahr der Berechnung einer mittleren Abweichung vom Mittelwert (Streuung, σ) oder der einer mittleren Abweichung des Mittelwertes (ε) aus nur 4 Erythrozytenzählungen.

Es gibt in der biologischen Statistik kein allgemein gültiges und in jedem Falle anwendbares Gesetz, das die an eine Signifikanz zu stellenden Anforderungen ein für allemal festlegt. In gewissen Grenzen kann und muß sie jeder Untersucher selbst bestimmen. Wir sehen aber aus den hier absichtlich etwas breit ausgeführten Beispielen, daß die Anforderungen an eine im Sinne der Statistik signifikante Differenz den jeweiligen Versuchsbedingungen sinnvoll angepaßt werden muß. Hierbei sind die Zahl der Versuchstiere, die Zahl der Einzelbeobachtungen und die

Genauigkeit der zur Verfügung stehenden Methodik ganz besonders zu berücksichtigen.

Anhangsweise muß noch auf die Abb. 4 eingegangen werden. Sie gibt Auskunft über das Körpergewicht ausgewachsener Kaninchen und über das junger Meerschweinchen unter dem Einfluß von subkutanen Cerinjektionen. Oelkers und Vincke (a. a. O III) beobachteten nämlich in vitro eine Hemmung der Pankreasdiastase und der Serumlipase durch Cer. Dieser Befund könnte vielleicht auf eine gewisse roborierende Wirkung des Cers hindeuten. Eine solche wäre dann unter Umständen eine Erklärung für die von einigen eingangs erwähnten Praktikern beobachtete „günstige" Wirkung der Cermedikation bei Anämien und

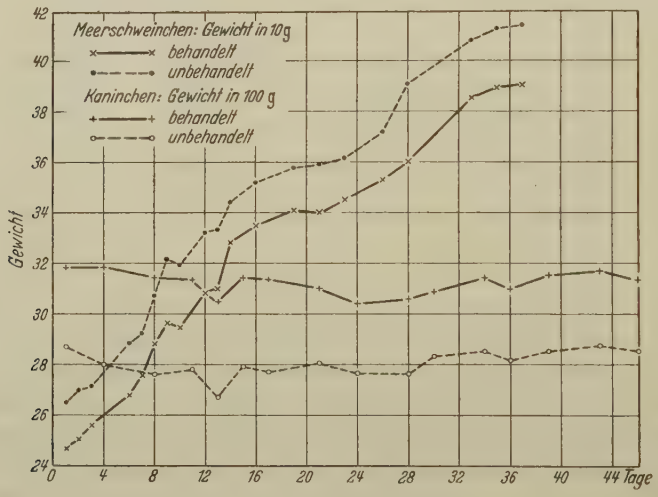


Abb. 4.

anderen Krankheitszuständen. Wir prüften daher das Körpergewicht von 10 ausgewachsenen Kaninchen und das von 10 jungen Meerschweinchen, von denen je 5 Tiere unbehandelt blieben. Unter im übrigen gleichen Bedingungen wurde den 5 Meerschweinchen je 1 mg Cer-III-Ion pro Tag, den 5 Kaninchen die in der 1. Versuchsreihe erwähnte Dosis subkutan injiziert.

Aus dem völlig gleichsinnigen Verlauf der in Abb. 4 dargestellten Gewichtskurven (jeder Punkt ist der Mittelwert aus 5 Wägungen) ist zu ersehen, daß das Cer in den verabfolgten Dosen keinen Einfluß auf das Körpergewicht hat. Es ist kein Roborans und bewirkt auch keine Gewichtsabnahme; es fördert nicht das Wachstum junger Tiere und hemmt es auch nicht. Die Schwankungen in den Gewichtskurven haben mit einer Cerwirkung nichts zu tun.

Zusammenfassung.

Das Ergebnis der 3 in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsreihen läßt sich dahingehend zusammenfassen, daß Cer

1. keinen Einfluß hat auf das Blutbild normaler Kaninchen;

2. bei anämischen Kaninchen
   a) mit Sicherheit keine Förderung,
   b) mit großer Wahrscheinlichkeit keine Hemmung der Erythropoese zur Folge hat.

Es kann daher als ziemlich indifferent für das periphere Blut und für die die Blutzellen regenerierenden Organe bezeichnet werden.

3. Hat Cer keine roborierende Wirkung und ist in den verabfolgten Dosen für das Wachstum junger Tiere irrelevant.

Im ganzen können die erhobenen Befunde als Beitrag zu der relativ geringen Toxizität des Cers aufgefaßt werden.

Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse konnten folgende Punkte herausgestellt werden:

1. Die aus wenigen Einzelbeobachtungen errechneten σ- und ε-Werte sind sehr vorsichtig zu beurteilen;

2. die Anforderungen an eine Signifikanz beim Vergleich zweier Mittelwerte können in gewissen Grenzen variiert, müssen aber den jeweiligen Versuchsbedingungen sinnvoll angepaßt werden;

3. die Fehlermöglichkeit, die in der in praxi nach oben begrenzten Anzahl von Versuchstieren liegt, kann in vielen Fällen durch Vermehrung der Einzelbefunde pro Tier bis zu einem gewissen Grade ausgeglichen werden.

Literatur.

[1] Remy, H.: Lehrbuch der Anorganischen Chemie, Bd. II, S. 515, 2. u. 3. Aufl. Leipzig: Akad. Verl. Ges. Becker u. Erler K. G. 1942. — [2] Pfeiler: Tierärztl. Rdsch. **1928**, 40. — [3] Pfeiler: Zbl. f. inn. Med. **49**, 1540 (1932). — [4] Peters, R.: Med. Klin. **1928**, 587. — [5] Bobrik, L.: Med. Klin. **1926**, 892. — [6] Katz, G., u. G. Schiller: Therapie der Gegenwart **1926**, 110. — [7] Grenet, H., u. H. Drouin: zit. ges. nach Ber. Ges. Physiol. **4**, 438 (1921). — [8] Levin, C.: Med. Klin. **1924**, 1317. — [9] Ishiwari, F.: Gann., XXXI, 29 (1927); zit. nach [10]. — [10] Maxwell, L. C., u. F. Bischoff: J. Pharmacol. a. exper. Therap. **43**, 65 (1931). — [11] Mori, J.: Jap. J. med. Sci., Trans. IV Pharmakol. **5** (1931); zit. nach Steidle[17]. — [11a] Zit. nach Ber. Ges. Physiol. **66**, 142 (1932). — [12] Hara, S.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **100**, 235 (1923). — [13] Oelkers, H. A., u. E. Vincke: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. I.—III. Mitt. **187**, 594 (1937); **188**, 53 u. 465 (1938). — [14] Guidi, G.: Arch. internat. Pharmacodyn. **37**, 305 (1930). — [15] Niccolini, P.: Arch. internat. Pharmacodyn., **37**, 199 (1930). — [16] Grenet, H., u. H. Drouin: zit. nach Steidle[17]. — [17] Steidle, H.: Handb. exper. Pharm. **III/4**, 2204 (1935). Berlin: Springer. — [18] Oortgiese, A.: zit. nach Ther, Pharmakol. Methoden, S. 132 (siehe [25]). — [19] Trachtenberg, F.: Fol. Hämatol. **42**, 1 (1932). — [20] Wirth, D., u. F. Kubasta: Fol. Hämatol. (Lpz)

62, 43 (1939). — [21] Wolf, H., R. Tschesche, E. Kröger u. J. Wolf: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 188, 423 (1938). — [22] Dustin jr. P.: Bull. Acad. r. Belg., Cl. Sci., V. s. 27, 260 (1941); zit. nach Ber. Physiol. 129, 323. — [23] Fisher, R. A.: Statistical Methods for Research Workers. Edinburgh and London: Oliver and Boyd 1948. — [24] Burn, J. H.: Biolog. Auswertungsmethoden, Berlin 1937. — [25] Ther, L.: Pharmakologische Methoden. Stuttgart: Wiss. Verl. Ges. m. b. H. 1949. — [26] Weber, E.: Grundriß der biol. Statistik für Naturwissenschaftler und Mediziner. Jena: Gustav Fischer 1948. — [27] Wigand, R., G. Herrnring u. K. Soehring: Arch. int. Pharmacodyn. 1950, im Druck. — [28] Meyer, Fr.: Zool. Anz. (im Druck).

Dr. Fr. Meyer, Hamburg-Wilhelmsburg, Schönenfelder Str. 22.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 257—264 (1950).

Aus dem Institut für Hirnforschung und allgemeine Biologie Neustadt (Schwarzw.)
(Direktor: Prof. Dr. O. Vogt).

Über die Durchblutung der Rattenniere bei Polyurie.

Von

Wilhelm Höpker.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. Dezember 1949.)

Unsere Kenntnisse über die Beziehung zwischen Nierendurchblutung und Nierenfunktion sind noch sehr begrenzt. Alle Methoden, welche die Durchblutungsgröße oder den Sauerstoffverbrauch sowie die Filtrations- und Exkretionsleistung des Organes summarisch erfassen, können uns keine Auskunft darüber geben, auf welche Weise die Niere die physiologischen und pathologischen Schwankungen der Menge und des spez. Gewichtes des Harnes reguliert. Diese Größen als Ausdruck der Nierenfunktion müssen notwendigerweise in einer engen ursächlichen Beziehung zu einem uns noch unbekannten Durchblutungsmodus stehen.

Versuche zur Aufdeckung dieser Beziehung liegen vor allem von E. Frey[1, 2] vor, der Kaninchen Tusche in die Aorta injizierte und so versuchte, anatomische Bilder der Durchblutung beim Konzentrations- und Verdünnungsversuch zu gewinnen. Bei Salzdiurese waren die Glomeruli gefüllt, während das Mark weniger Tusche zeigte; umgekehrt wiesen die Glomeruli bei der Wasserdiurese eine geringe Blutfüllung auf. Nach Hypophysin war eine starke Rindenfüllung zu erkennen, während an der Grenze zwischen Rinde und Mark ein blasser Streifen auftrat, in dem E. Frey die Schaltstelle (= Umschaltung von Glomerulus- auf Tubulusdurchblutung) annimmt. Der Autor schließt daraus, daß die Harneindickung durch Glomerulusfiltration und Rückresorption in den Tubuli contorti I erfolgt, während die Harnverdünnung durch Wasserausscheidung in den Tubuli contorti II bewirkt wird. — Die Befunde E. Freys werden von Fuchs und Popper[3] bestätigt. — Eingehende Untersuchungen haben Trueta u. Mitarb.[3] zur Aufdeckung der Anurie beim „crush Syndrom" angestellt. Ihre Ergebnisse wurden von uns a. a. O.[4, 5] diskutiert, so daß sich hier eine nähere Darstellung erübrigt. Hier sei nur bemerkt, daß ihre Ergebnisse, ebenso wie die sich daran anschließenden theoretischen Erwägungen von Craik[6] und uns[4], erstmalig nähere Einblicke in die ursächliche Beziehung zwischen Durchblutung und Harnbereitung im obigen Sinne gewähren konnten.

Die experimentellen Schwierigkeiten bei der Darstellung der Nierendurchblutung liegen in folgendem: a) Kontrastmittel oder Tusche müssen, wenn man gute Ergebnisse erzielen will, in hoher Konzentration an das Organ herangebracht werden. Bei Injektionen in die Aorta stellen diese Konzentrationen erhebliche Störfaktoren dar, da die Regulation

der Nierendurchblutung sehr empfindlich ist und nicht nur auf nervale Reize reagiert, die bei direkter Injektion in die A. renalis nicht zu vermeiden sind, sondern auch auf humorale. b) Klemmt man nach unserem Vorgehen die Gefäße der Niere plötzlich ab, so kommt es zu einer intrarenalen Gefäßkontraktion, die vor allem die Arterien betrifft. Dabei gleichen sich die intravasalen Druckdifferenzen innerhalb des Organes aus. Außerdem treten während der Fixierung hypostatische Blutverlagerungen auf, die ebenfalls das Bild der ursprünglichen Blutverteilung verändern. Um diese Fehler möglichst klein zu halten, muß man rasch wirkende Fixiermittel anwenden und kleine Organe. Am zweckmäßigsten wäre eine Fixierung in flüssiger Luft und anschließender Trocknung im Vakuum, wozu uns jedoch jegliche Mittel fehlen. Wir mußten uns deshalb darauf beschränken, möglichst kleine Organe zu nehmen, um eine rasche Durchfixierung zu erreichen. Nach Versuchen an Meerschweinchen und Kaninchen sind wir deshalb wieder zu Ratten zurückgekehrt, da bei diesen die Fehlerquellen noch am geringsten waren und man die besten Bilder erhalten konnte. Trotzdem aber — und das kann nicht genügend betont werden — lassen sich nur Bilder verwenden, die besonders auffällige Veränderungen in der Blutverteilung aufweisen.

Über die Ergebnisse unserer bisherigen Studien an Rattennieren haben wir bereits ausführlich berichtet[5]. Dabei wurden auch Beobachtungen bei polyurischen Zuständen kurz gestreift. Da diesen eine prinzipielle Bedeutung zukommt, wurden weitere Versuche in dieser Richtung angestellt, über die hier berichtet werden soll.

Tabelle 1.

Versuch	Ratte Nr.	Gew. g	Geschl.	Menge d. physiol. NaCl-Lsg. cm³	Salyrgan cm³	Zeit min.	Läppchenzeichnung
physiol. NaCl-Lösung subkutan	57	160	m	4,0		73	∅
	58	140	m	4,0		123	∅
physiol. NaCl-Lösung + Salyrgan subcutan	47	80	w	5,0	0,05	60	?
	55	80		4,0	0,1	48	∅
	51	80	m	6,0	0,12	45	+
Wasser per Magensonde	63	150	m	5,0		48	+
	61	180	m	5,0		60	+
	66	170	m	5,0		63	∅*
	67	170	m	5,0		67	+
	68	150	m	4,7		80	+
	59	125	m	4,0		100	∅
Tödl. Salyrgandosis + physiol. NaCl-Lösung subkutan	53	80	w	8,0	0,4	30	+
	72	115	w	4,0	0,5	26	+
	73	120	w	3,6	0,4	29	+
	74	120	w	4,0	0,5	32	+

* Tier 66 zeigte eine anämische Nierenrinde (infolge Pleuraeröffnung, Kollaps ?).

Methodik.

Verwandt wurden 15 Ratten, von denen eine Gruppe physiol. NaCl-Lösung, eine zweite physiol. NaCl-Lösung + Salyrgan subkutan injiziert erhielt. Einer weiteren Gruppe wurde Brunnenwasser durch den Magenschlauch eingegeben und eine vierte Gruppe erhielt eine tödliche Salyrgandosis + physiol. NaCl-Lösung subkutan. Die näheren Daten sind auf Tab. 1 angegeben. Die Polyurie, die bei der 1. und 4. Gruppe ausblieb, wurde aus Harnmenge und Harnfarbe (Filtrierpapier) geschätzt. Auf dem Höhepunkt der Diurese wurde laparatomiert, zuerst die linke, dann die rechte Niere abgeklemmt, exstirpiert, abgebunden und in die Fixierflüssigkeit verbracht. Von jeder Niere wurden Gefrierschnitte von 50 μ Dicke hergestellt und mit Benzidin nach der Methode von Slonimski und Cunge[7] gefärbt.

Ergebnisse.

Auf dem Höhepunkt der Diurese läßt sich bei den meisten Nieren schon makroskopisch in situ eine Änderung der Oberflächenstruktur erkennen: Es tritt das auf, was man am besten wegen der Ähnlichkeit mit der normalen Leberläppchenstruktur mit „*Läppchenzeichnung*" benennt. Die ganze Niere weist feine dunkle Punkte in regelmäßiger Verteilung auf, genau so, wie die durch die Leberkapsel durchschimmernden einzelnen Leberläppchen diesem Organ das charakteristische Aussehen verleihen. Diese Läppchenzeichnung wurde bei allen unseren anderen Versuchen nicht beobachtet; sie tritt anscheinend nur bei polyurischen Zuständen auf. Normale Nieren lassen zwar auch bei genauem Hinsehen oder mit der Lupe eine feine Läppchenzeichnung erkennen, doch ist kein Vergleich zwischen dieser und der bei Polyurie.

In den Fällen von Polyurie, in denen die Läppchenzeichnung nicht wahrgenommen werden konnte, scheint dies dadurch bedingt zu sein, daß einmal die Polyurie noch nicht ihren Höhenpunkt erreicht (55) oder schon überschritten hat (59). Bei Tier 66 wurde versehentlich die Pleura eröffnet; die dadurch bedingte Dyspnoe und Tachypnoe führte zu einer Rindenanämie der Niere.

Das mikroskopische Bild deckt die Ursachen dieser Läppchenzeichnung auf. Normalerweise bildet die oberste Rindenschicht ein ziemlich einheitliches und gleichmäßig gefülltes Kapillarnetz. Zwar läßt sich auf oberflächlich geführten Flachschnitten noch deutlich die Lobuluseinteilung erkennen, doch ist diese nur mikroskopisch, nicht makroskopisch sichtbar. Das oberflächliche Kapillarnetz bedingt die Farbe der Nierenoberfläche und ist normalerweise blutreich (Abb. 1). Bei der verdünnenden Niere ist dieses Kapillarnetz teilweise blutleer, vor allem in dem Gebiet der Markstrahlen, so daß diese als helle Zonen an die Kapsel herantreten und auf dem Schnitt eine Speichenstruktur bedingen. Ausgesprochen mit Blut gefüllte Kapillaren finden sich nur dicht um die V. lobularis herum angeordnet, welche selbst durchweg stark gefüllt ist, stärker wie dies normalerweise der Fall ist (Abb. 2). Außerdem hat man den Eindruck, daß die Blutfüllung der Lobuli nach der Mark-

Rindengrenze zu abnimmt, so daß die Markstrahlen teilweise keilförmig in die Rinde vorspringen.

An den Markkapillaren und -Venen läßt sich kein Unterschied gegenüber der Norm feststellen. Es scheint so zu sein, daß diese Gefäßprovinz in der Niere bei der Kontraktion der Arterien und der damit verbun-

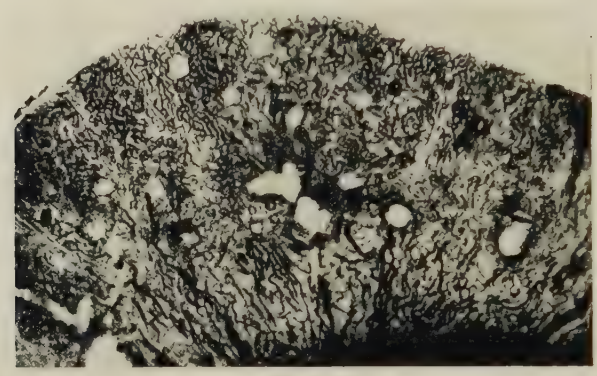


Abb. 1. Normales Bild der Rindendurchblutung. Die Lobuluseinteilung ist gut zu erkennen. Die Markstrahlen treten nicht immer deutlich hervor. Unter der Kapsel ist das Kapillargeflecht ziemlich einheitlich. (R. 5, li. Niere, 80 μ SLONIMSKI, 25 : 1.)

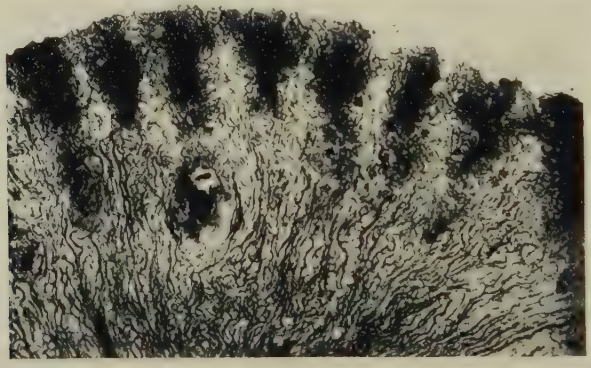


Abb. 2. Bild der Rindendurchblutung bei Polyurie: „Läppchenzeichnung". Deutlich sind die an der Basis verbreiterten bis an die Kapsel verfolgbaren Markstrahlen erkennbar. In den Lobuli sind vorwiegend die Kapillaren direkt um die V. lobularis gefüllt. Letztere weist eine vermehrte Füllung auf. (R. 61, li. Niere, 50 μ, SLONIMSKI, 25 : 1.)

denen Blutentleerung sehr viel Blut aufnehmen und so die weitgehendsten sekundären Veränderungen aufweisen. Nur die Gruppe 4 fällt ganz aus dem Rahmen des üblichen: Bei den mit Salyrgan vergifteten Tieren ist in allen Schnitten eine hochgradige Überfüllung der Glomeruli festzustellen. Daneben sind die Venae lobulares maximal gefüllt, das Kapillargeflecht der Rinde selbst aber fast blutleer. Im Mark aber fällt

die ganz massive Füllung der Venenbüschel auf, die sonst bei den polyurischen Nieren kaum gefüllt sind und daher nicht in Erscheinung treten (Abb. 3).

Diskussion.

Der Befund der Läppchenbezeichnung, der einer bestimmten Durchblutung der Lobuli entspricht, ist bemerkenswert. Dadurch, daß schon makroskopisch in situ eine gegenüber der Norm veränderte Blutverteilung in Form der Läppchenzeichnung in Erscheinung tritt, läßt sich der Schluß ziehen, daß diese Veränderung der Blutverteilung nicht erst sekundär nach Abklemmen der Hilusgefäße entstanden, sondern primärer Art ist. Da diese Läppchenzeichnung nur bei polyurischen Nieren beobachtet wurde und auch hier nur auf dem Höhepunkt der Polyurie, so liegt die Schlußfolgerung nahe, daß die Läppchenzeichnung ein Äquivalent des polyurischen Funktionszustandes darstellt. So kann gezeigt werden, daß Durchblutungsmodus und Funktion in einer ursächlichen Beziehung zueinander stehen, etwas, was bisher nur theoretisch gefordert wurde, wofür aber die experimentellen Unterlagen fehlten. Daß die Regulierung der Durchblutung einzelner Nierenabschnitte die Funktion bestimmt — eine Schlußfolgerung, zu der man auf Grund der vorliegenden Beobachtungen berechtigt ist — war bisher eine weitgehend angezweifelte Arbeitshypothese, und wurde wohl nur von E. Frey vertreten.

Abb. 3. Durchblutungsbild der Niere bei Salyrganvergiftung. Kurz vor dem Tode. Deutlich treten die extrem mit Blut gefüllten Glomeruli hervor, während die Rinde sonst blutleer ist. Auffällig ist weiterhin das strotzend mit Blut gefüllte Mark, in dem wieder besonders die Venenbüschel hervortreten. (R. 53, re. Niere, 50 μ, Slonimski, 10 : 1.)

A.a.O. wurde die Vorstellung entwickelt, wonach die Variabilität des Harnes nach Menge und spez. Gewicht durch das Ineinandergreifen der Funktion der beiden Nephronenarten (I und II) bedingt ist: I (nach Peter[8], Trueta[3]: juxtamedulläre Glomeruli) produziert wenig, aber konzentrierten Harn, II dagegen einen reichlichen und dünnen Harn. Die nervale und humorale Steuerung der Durchblutung, für die Trueta sowie Höpker und Meessen einige Beispiele aufgezeigt haben, bedingt dann die Funktion. Diese Hypothese machte nicht nur die

Diurese der normalen Niere verständlich, was bisher weder durch die Ergebnisse der Clearencemethoden, noch durch die Messung des Sauerstoffverbrauches (Arbeit) oder der Durchblutungsgröße möglich war. Auch die Nierenfunktionsstörungen, z. B. beim extrarenalen Nierensyndrom ließen sich zwanglos erklären. Es ließ sich dabei ebenfalls die Entwicklung pathologisch-anatomischer Veränderungen hinsichtlich ihrer Lokalisation und ihrer Verursachung in einem neuen Lichte darstellen. Es liegt nahe, diese Hypothese den obigen Befunden gegenüberzustellen und man erkennt zunächst Widersprüche. Es wurde angenommen, daß bei Polyurie die kapselnahen Glomeruli in Funktion sind. Ihre Tubuli contorti werden versorgt von dem intertubulären Kapillargeflecht, das sein Blut aus den Vasa efferentia dieser Glomeruli bezieht (Trueta). Man möchte deshalb annehmen, daß bei Polyurie gerade diese Gebiete besonders durchblutet werden, während die marknahen Abschnitte weniger Blut aufweisen. Das scheint zunächst nach unseren Versuchen nur teilweise der Fall zu sein. Zur Erklärung dieses Widerspruches muß folgendes festgestellt werden: a) das, was mit unserer Methode dargestellt wird, sind die Rückflußgebiete, d. h. alle Gebiete, die den niedrigsten Druck in der Niere aufweisen. Arterien und Vasa afferentia und efferentia sind leer. Man kann also das hier wiedergegebene Durchblutungsbild nicht ohne weiteres dem wirklichen Durchblutungszustand in vivo gleichsetzen. Deshalb sind alle Schlußfolgerungen in dieser Richtung u. E. verfehlt. Auch die Tatsache, daß das Gebiet der juxtamedullären Glomeruli an der Basis der Lobuli besonders wenig Blut aufweist, möchten wir noch nicht als einen Beweis unserer Hypothese auffassen. b) Ferner sei bemerkt, daß auch Kos-lowski (brfl. Mitteilung) nicht in der Lage war, an der Rattenniere die Befunde Truetas hinsichtlich der Zweiteilung der Nierenstrombahn zu bestätigen. Es besteht deshalb die Möglichkeit, daß die Tierarten untereinander sich verschieden in der regionalen Anordnung der Nephrone verhalten, was sich bei der Darstellung der Kapillararchitektonik weitgehend bestätigt.

Hier sei nur festgestellt, daß ein bestimmter Funktionszustand der Niere, nämlich die Polyurie, begleitet ist von einem bestimmten Durchblutungsmodus, dem eine für die Funktion ursächliche Bedeutung zukommt.

Eine besondere Stellung nimmt der Befund bei Salyrganvergiftung ein. Die Veränderungen scheinen auf der Wirkung des Quecksilbers zu beruhen und bestehen in einer Rindenanämie, bei der die Glomeruli exzessiv hyperämisch sind; ferner sind auch die Venenbüschel außerordentlich stark mit Blut gefüllt (Abb. 5), so daß man den Eindruck gewinnt, daß hier zweierlei vor sich geht: Einmal führt die Salyrganüberdosierung zu einer Rindenanämie, wie wir sie auch sonst bei verschiedenen Zuständen kennen[5]; zum anderen aber liegen noch besondere

Verhältnisse an den Glomeruluskapillaren vor, die dazu führen, daß diese sich übermäßig mit Blut füllen, d. h. ihren Tonus verlieren und beim intrarenalen Druckausgleich maximal mit Erythrozyten vollgestopft werden (Stase). Es liegt nahe, dies auf eine direkte Schädigung der Glomeruluskapillaren durch Salyrgan zurückzuführen. Auch hier liegt die Bedeutung des Befundes weniger im Detail, als in der Tatsache, daß bei Salyrganvergiftung zunächst schwerste Durchblutungsstörungen auftreten, die ihrerseits u. E. weitgehend anatomische Veränderungen bedingen.

Die Nierendurchblutung beim Konzentrieren.

Es liegt nahe, diese Befunde denen gegenüberzustellen, die sich bei einer konzentrierenden Niere erheben lassen. Wie aus Tabelle 2

Tabelle 2.

Ratte Nr.	Geschl.	Gew. g	Durst eit	Nierenbefund
60	m	140	6 Std	normales Bild
64	m	200	17 Std	normales Bild
65	m	160	17 Std	Hyperämie der äußeren Rinde
54	w	195	22 Std	geringe Hyperämie der äußeren Rinde
37	m	300	24 Std	mäßige Rindenanämie
48	w	225	25 Std	geringe Hyperämie der ganzen Rinde
52	w	175	25 Std	deutliche Anämie der ganzen Rinde
33	w	190	38 Std	mäßige Anämie der ganzen Rinde
69	m	125	49 Std	deutliche Anämie der ganzen Rinde
70	m	100	49 Std	mäßige Hyperämie der äußeren Rinde
71	m	115	49 Std	geringe Anämie der Rinde

hervorgeht, läßt sich eine besondere Abhängigkeit der Durchblutung nur etwa in dem Sinne feststellen, daß die Nieren um so rindenanämischer werden, je länger der Durstzustand besteht. Weitere Beziehungen lassen sich mit dieser Methode nicht nachweisen.

Zusammenfassung.

1. Bei polyurischen Zuständen, die bei der Ratte durch Salyrgan + physiol. NaCl-Lösung sowie durch Zufuhr von Wasser per Magenschlauch hervorgerufen werden, läßt sich an den Nieren makroskopisch eine sonst nicht auftretende eigenartige Struktur feststellen, die *Läppchenzeichnung* genannt wird.

2. Dieser Läppchenzeichnung entspricht mikroskopisch ein besonderer Durchblutungsmodus in der Niere, der darin besteht, daß hauptsächlich nur die Kapillargeflechte dicht um die V. lobularis herum gefüllt sind, die Gebiete der Markstrahlen aber leer bleiben. Außerdem zeigen auch die Kapillargeflechte an der Basis der Lobuli eine verminderte Durchblutung.

3. Da dieses Phänomen ausschließlich bei Polyurie gefunden wurde, wird geschlossen, daß dieser besondere Durchblutungsmodus ursächlich mit der Polyurie in Beziehung steht.

4. Bei tödlicher Salyrgandosis tritt eine Rindenanämie auf, die Glomeruli sind strotzend mit Blut gefüllt und auch die Büschelvenen zeigen eine maximale Blutfülle.

5. Die Nierendurchblutung der konzentrierenden Niere zeigt nach der hier angewandten Methode der Blutkörperchenfärbung keine Veränderungen.

Literatur.

[1] Frey, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **177**, 134 (1935). — [2] Frey, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **182**, 633 (1936). — [3] Trueta, J., A. Barclay, P. Daniels, K. Franklin u. M. Prichard: Studies on the renal circulation, Oxford 1947. — [4] Höpker, W.: Ärztl. Forschg. **3**, 321 (1949). — [5] Höpker, W., u. H. Meessen: Ärztl. Forschg. **4**, 1 (1950). — [6] Craik, J. E.: Glasgow Med. J. **29**, 238 (1948). — [7] Slonimski, P., u. M. Cunge: Fol. morph. (Pol.) **7**, 1 (1937). — [8] Peter, K.: Untersuchungen über Bau und Entwicklung der Niere. Jena 1909. — [9] Fuchs, F., u. H. Popper: Erg. inn. Med. **54**, 1 (1938).

Dr. Wilhelm Höpker, Neustadt/Schwarzw., Institut für Hirnforschung.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 265—280 (1950).

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. K. Matthes).

Über die Änderungen der Anspannungs- und Austreibungszeit sowie der physikalischen Kreislaufgrößen nach Adrenalin beim gesunden Menschen.

Von

K. Mechelke und E. Nusser.

Mit 9 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. September 1949.)

Die physiologische Bedeutung des Adrenalins sieht Rein[1] vor allem in der Regelung der Blutverteilung. Die lokale Kreislaufwirkung des Adrenalins ist mit seiner lokalen Stoffwechselwirkung eng verknüpft. Im ruhenden Muskel bewirkt es nicht nur eine Gefäßkonstriktion, sondern auch eine Senkung des lokalen Stoffwechsels, während im arbeitenden Muskel eine Gefäßdilatation und Mehrdurchblutung mit Steigerung der Verbrennungsprozesse eintritt.

Nach den Ergebnissen zahlreicher Untersuchungen können wir uns nach größeren Adrenalindosen den Reaktionsablauf im Kreislauf folgendermaßen vorstellen:

Das Pharmakon entfaltet seine Wirkung gleichzeitig direkt am Herzen und am peripheren Kreislauf. Durch die Vasokonstriktion der Venen und Entleerung der Blutspeicher kommt es zu einer Förderung des venösen Rückstromes und somit zum Venendruckanstieg. Diese Wirkung ist tierexperimentell von Gollwitzer-Meier[2] und Rein[3], sowie am menschlichen Kreislauf von Matthes[4] nachgewiesen. Das Herz versucht das vermehrte Blutangebot durch Frequenzsteigerung und Erhöhung des Schlagvolumens zu bewältigen. Da das Maximum des Venendruckanstieges mit dem Frequenzmaximum zusammenfällt, ist es wahrscheinlich, daß der Anstieg des Druckes im rechten Vorhof über den Bainbridge-Reflex die Frequenzsteigerung auslöst. Die gleichzeitige Zunahme des Schlagvolumens führt zu einer beträchtlichen Steigerung des Minutenvolumens. Demzufolge tritt eine Blutdrucksteigerung auf (Matthes[4], Euler und Liliestrand[5], Wezler und Böger[6]). Mit dem Absinken des Venendruckes findet Matthes[4] (siehe Matthes Abb. 150, 151 und 152) einen weiteren Anstieg des systolischen Blutdruckes auf sein Maximum und hierdurch ausgelöst die Reizung der arteriellen Pressorezeptoren, die zu reflektorischer Bradykardie führt. Dieses für die Initialphase typische Kreislaufverhalten ist jedoch nicht die Regel. Wezler[7] und Stollreiter[8] weisen auf den großen Einfluß der vegetativen Ausgangslage auch für diesen Regulationsablauf hin. Die unterschiedliche vegetative Ausgangslage erklärt es, daß z. B. bei sympathikotoner Ruhekreislaufeinstellung nach Adrenalin eine Senkung des Minutenvolumens zustande kommen kann.

Der periphere Strömungswiderstand zeigt nach Adrenalin initial überwiegend eine Abnahme (Sack und Bernsmeier[9], Jarisch[10], Grollmann und Baumann[11], Hartel und Bonsmann[12], Wezler und Böger[6]). Der plötzliche Anstieg der

Oxydationsvorgänge, der wohl außer im Herzen auch in anderen Organen eintreten dürfte und eine örtliche Anoxämie zur Folge hat, führt zu einer Mehrdurchblutung in diesen Gefäßgebieten, die insgesamt dann zu einer Senkung des Gesamtwiderstandes führen wird, wenn sie nicht durch Widerstandserhöhung in anderen Gefäßgebieten ausgeglichen werden kann. Stollreiter[8] sieht in der gleichzeitigen Erhöhung des peripheren Widerstandes und des Minutenvolumens den Ausdruck einer vegetativen Gleichgewichtsstörung, wie er sie bei kreislauf-labilen Menschen beobachten konnte. Da Matthes[4] während des Anstieges des Schlag- und Minutenvolumens bei Senkung des peripheren Strömungswiderstandes eine Durchblutungsabnahme der Haut findet, nimmt er in diesem Stadium eine Zentralisation des Kreislaufs mit stärkerer Durchblutung des Körperkernes und verminderter Durchblutung der Schale an. Mit dem Abfall des Venendruckes und dem weiteren Anstieg des systolischen Blutdruckes auf seinen Maximalwert, tritt mit einsetzender vagischer Gegenregulation eine Erhöhung des arteriellen Gesamtwiderstandes ein, so daß man jetzt auch eine vermehrte Vasokonstriktion im Körperinnern annehmen kann. Mit dem Abklingen der Blutdrucksteigerung dürfte die Durchblutung zuerst im Körperinnern verstärkt werden, da die Vasokonstriktion im Hautgebiet nur langsam nachläßt und das Minutenvolumen wieder ansteigt bei gleichzeitigem Absinken des peripheren Strömungswiderstandes.

Deppe und Diefenhardt[13], sowie Deppe, Kapal und Kirchhoff[14] konnten während Muskelarbeit und nach i. v. Adrenalininjektion eine weitgehende qualitative und quantitative Übereinstimmung der Kreislaufregulation bei der gleichen Versuchsperson feststellen. Stollreiter[8] fand in neueren Untersuchungen ebenfalls am normalen Kreislauf eine gewisse Gleichsinnigkeit der Adrenalinwirkung und Muskelarbeit. Bei pathologischen Kreislaufzuständen beobachtete er nach Adrenalinbelastung ein sehr unterschiedliches Verhalten der physikalischen Kreislaufgrößen, so daß er es zur Funktionsprüfung des Herz- und Gefäßsystems für ungeeignet hält.

Das Ziel unserer Untersuchungen war es, die Veränderungen der Anspannungs- und Austreibungszeit des Herzens nach intravenöser Gabe von 50 γ Adrenalin festzustellen. Es interessierte uns dabei vor allem die Frage, ob neben der Beeinflussung der Kontraktionsphasen des Herzens durch die physikalischen Kreislaufgrößen die Veränderungen der Anspannungs- und Austreibungszeit die Folge der Wirkung des Adrenalins am Herzmuskel selbst sind.

Methodik.

Wir führten die Untersuchungen an 5 herzgesunden Medizinstudenten durch. Die Ausführung der Registrierung und die Berechnung der physikalischen Kreislaufgrößen und der Anspannungs- und Austreibungszeiten erfolgte in gleicher Weise, wie bei den Privin- und Otrivinuntersuchungen (Mechelke und Nusser[15]). In allen Versuchen wurden 50 γ Adrenalin in 20 sec i. v. verabfolgt. In 3 Versuchen wurde die Herzdynamik fortlaufend bestimmt. Durch Lichtzeichen wurden die Zeitpunkte der Blutdruckmessung auf den Film übertragen, so daß eine Bestimmung der physikalischen Kreislaufgrößen in kürzeren Zeitabständen ebenfalls möglich war. Die Herzarbeit und Herzleistung wurden zusätzlich berechnet:

$$\text{Arbeit} = \text{Pm} \cdot \text{Vs} \qquad \text{Erg} \cdot 10^6$$

$$\text{Leistung} = \frac{\text{Arbeit}}{\text{Systolendauer}} \qquad \frac{\text{Erg} \cdot 10^6}{\text{sec}}$$

Ergebnisse.

Die Abb. 1 zeigt die Änderungen der physikalischen Kreislaufgrößen und der isometrischen und isotonischen Kontraktionsphasen des Herzens nach intravenöser Gabe von 50 γ Adrenalin bei der Versuchsperson He. Wir beobachten einen kurzfristigen, nur wenige Minuten dauernden Reaktionsablauf, bei dem wir mehrere Phasen der Adrenalinwirkung

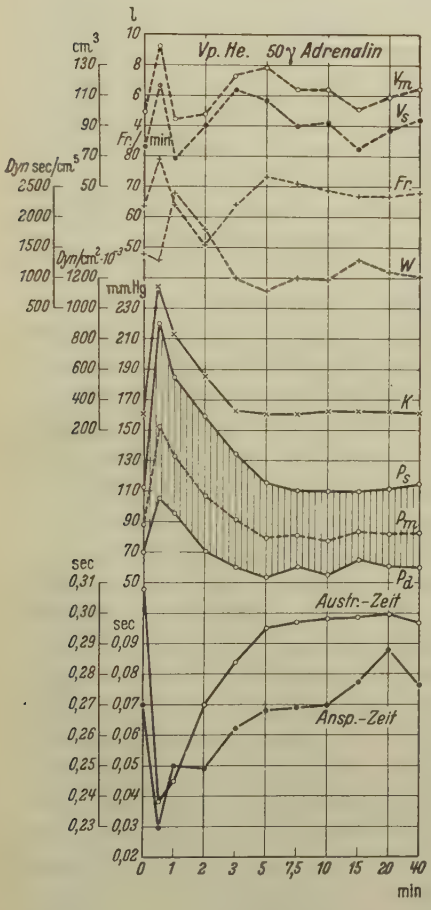


Abb. 1.

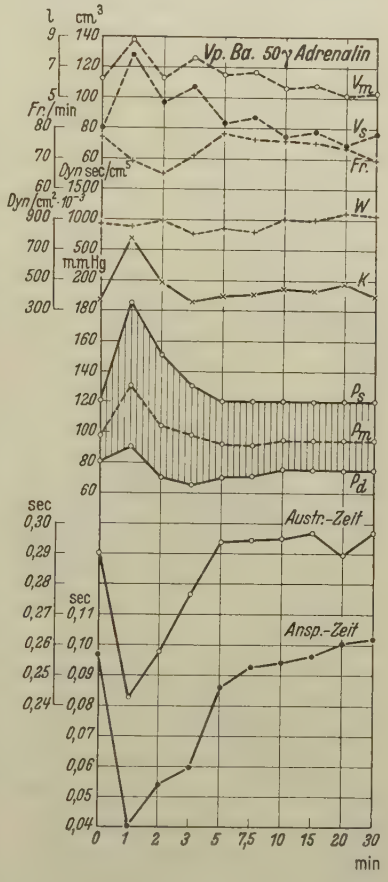


Abb. 2.

Abb. 1. Vp. He. i. v. Injektion von 50 γ Adrenalin Injektionsdauer: 20 sec. Vm = Minutenvolumen, Vs = Schlagvolumen, Fr = Pulsfrequenz, W = Periph. Strömungswiderstand, K = Volumelastizitätsmodul, Ps = Systolischer Blutdruck, Pd = Diastolischer Blutdruck, Pm = Mitteldruck, Ansp.-Z. = Anspannungszeit, Austr.-Z. = Austreibungszeit. — Zeit in Minuten.

Abb. 2. Vp. Hö. i. v. Injektion von 50 γ Adrenalin Injektionsdauer: 20 sec. Vm = Minutenvolumen, Vs = Schlagvolumen, Fr = Pulsfrequenz, W = Periph. Strömungswiderstand, K = Volumelastizitätsmodul, Ps = Systolischer Blutdruck, Pd = Diastolischer Blutdruck, Pm = Mitteldruck, Ansp.-Z. = Anspannungszeit, Austr.-Z. = Austreibungszeit. — Zeit in Minuten.

unterscheiden können. Initial (nach 30 sec) finden wir infolge der Tachykardie und der Schlagvolumenzunahme eine Erhöhung des Minutenvolumens bei erhöhtem Volumelastizitätsmodul und nur wenig vermindertem peripheren Strömungswiderstand. Diese Veränderungen bedingen die maximalen Steigerungen des systolischen und diastolischen Blutdruckes bei Vergrößerung der Blutdruckamplitude. Im Meßpunkt der 1. Minute sehen wir bei verminderter Herzschlagfolge ein Absinken des Schlag- und Minutenvolumens unter den Ausgangswert und eine deutliche Zunahme des peripheren Strömungswiderstandes. In der 3.—5. Minute finden wir wieder eine erhebliche Zunahme des Schlag- und Minutenvolumens bei herabgesetzten peripheren Widerständen. Der diastolische Blutdruck ist erniedrigt.

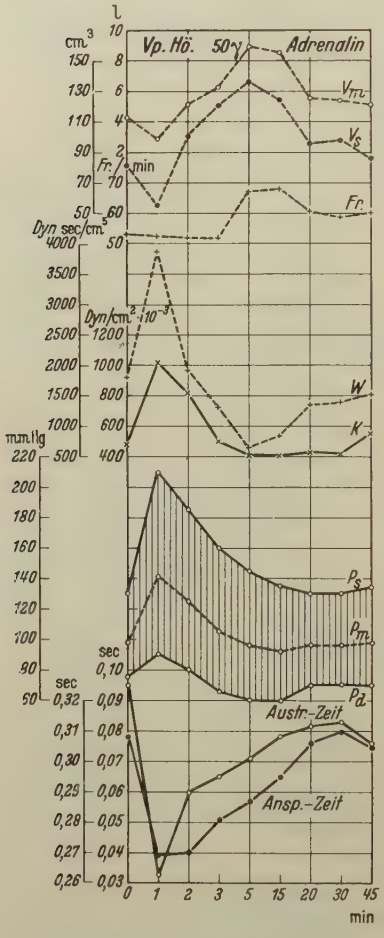


Abb. 3. Vp. Ba. i. v. Injektion von 50 γ Adrenalin Injektionsdauer: 20 sec. Vm = Minutenvolumen, Vs = Schlagvolumen, Fr. Pulsfreqpenz, W = Periph. Strömungswiderstand, K = Volumelastizitätsmodul, Ps = Systolischer Blutdruck, Ps = Diastolischer Blutdruck, Pm = Mitteldruck, Ansp. Z. = Anspannungszeit, Austr. Z. = Austreibungszeit. — Zeit in Minuten.

Dieser 3 phasische Reaktionsablauf steht in Übereinstimmung mit den von Böger, Deppe und Wezler[16] mitgeteilten Befunden. In dem gleichzeitigen Anstieg der Pulsfrequenz und des Schlagvolumens in der Initialphase sehen sie den Ausdruck der Sympathikuswirkung am Herzen bei gleichzeitig vermehrtem venösen Blutrückstrom. Der periphere adrenergische Effekt führt zu einer initialen Senkung des peripheren Strömungswiderstandes. Während der 2. Phase (Meßpunkt der 1. und 2. Minute) sehen wir in dem Anstieg des peripheren Strömungswiderstandes bei Verminderung der Herzschlagfolge die Kreislaufumstellungen der über arterielle Depressoren ausgelösten vagischen Gegenregulation, die das Bild der initialen Acceleranswirkung abschwächen.

Während dieses 3 phasischen Regulationsablaufes finden wir eine starke Verkürzung der isometrischen und isotonischen Kontraktions-

phase des Herzens. Die maximalen Verkürzungen der Anspannungs- und Austreibungszeiten beobachten wir bereits nach 30 sec. In den folgenden Minuten erreichen sie wieder ihre Ruheausgangswerte.

Bei der Versuchsperson A. H. (Abb. 2) ist die Initialphase mit Tachykardie, Schlag- und Minutenvolumenzunahme bei Herabsetzung des peripheren Strömungswiderstandes in diesem Versuch (siehe Abb. 5) nicht nachweisbar. Dieser Reaktionsablauf läßt somit nur 2 Wirkungsphasen erkennen. Im Meßpunkt nach 1 min finden wir bei geringer Pulsfrequenzabnahme ein vermindertes Schlag- und Minutenvolumen bei Erhöhung des peripheren Widerstandes und Steigerungen des systolischen und diastolischen Blutdruckes. Nach dem Verhalten von Volumelastizitätsmodul, der Pulsfrequenz und dem Schlagvolumen ist anzunehmen, daß wir hier bereits jenseits der Initialphase sind. Während der Zeit der 2.—15. min beobachten wir eine Zunahme des Schlagvolumens und mit steigender Frequenz einen noch stärkeren Anstieg des Minutenvolumens bei sinkendem peripheren Strömungswiderstand.

Auch in diesem Versuch treten erhebliche Verkürzungen der Anspannungs- und Austreibungszeiten ein. Die Maximalwerte für die

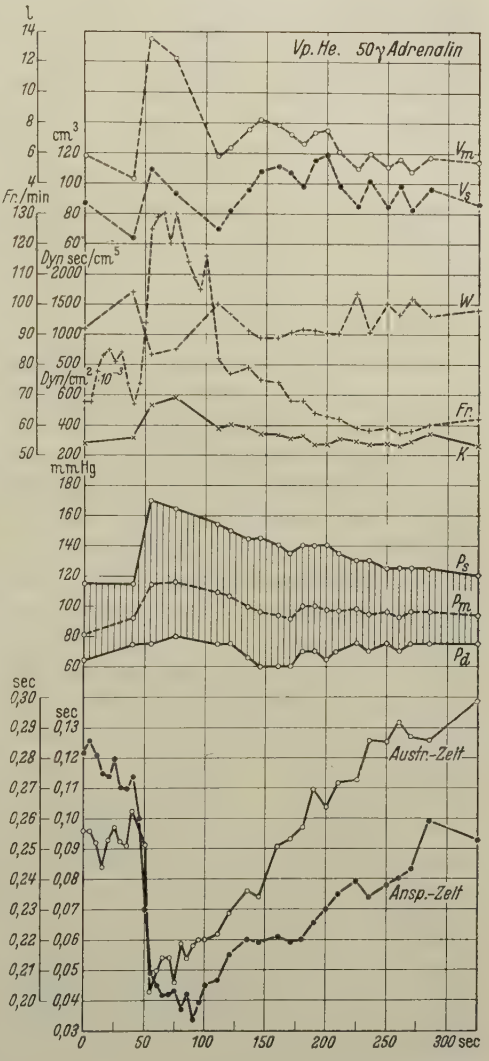


Abb. 4. Vp. He. i. v. Injektion von 50 γ Adrenalin Injektionsdauer: 20 sec. Vm = Minutenvolumen, Vs = Schlagvolumen, Fr = Pulsfrequenz, W. = Periph. Strömungswiderstand, K = Volumelastizitätsmodul, Ps = Systolischer Blutdruck, Pd = Diastolischer Blutdruck, Pm = Mitteldruck, Ansp. Z. = Anspannungszeit, Austr. Z. = Austreibungszeit. — Zeit in Sekunden.

Verkürzungen der isometrischen und isotonischen Kontraktionsphase des Herzens sehen wir nach 1 min. Sie haben sich nach 20 min nahezu wieder normalisiert.

Der Reaktionsablauf der physikalischen Kreislaufgrößen bei der Versuchsperson Ba. (Abb. 3) zeigt einen 1phasischen Ablauf, da die charakteristische Initialphase nicht erfaßt wurde und der periphere Strömungswiderstand keine wesentlichen Veränderungen zeigt (vgl. Abb. 6). Im Meßpunkt der 1. min sehen wir eine erhebliche Zunahme des Schlagvolumens bei etwas verminderter Herzschlagfolge und somit einen geringen Anstieg des Minutenvolumens. Mit dem Absinken des Schlagvolumens und der Normalisierung der Pulsfrequenz beobachten wir den Rückgang der systolischen und diastolischen Blutdruckerhöhungen. In Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen treten starke Verkürzungen der Anspannungs- und Austreibungszeit ein.

Die Untersuchungsergebnisse bei einer weiteren Versuchsperson zeigen keine Abweichungen von den bisherigen Befunden.

Da in diesen Versuchen die Veränderungen der physikalischen Kreislaufgrößen und der Anspannungs- und Austreibungszeiten besonders in der Initialphase nur lückenhaft erfaßt wurden, haben wir in 3 weiteren Versuchen die isometrischen und isotonischen Kontraktionsphasen fortlaufend bestimmt. Die Abb. 4 gibt einen derartigen Versuch wieder. Wir sehen 40 sec nach Beginn der Injektion (Injektionsdauer: 0—20 sec) das schlagartige Einsetzen einer starken Frequenzsteigerung bei gleichzeitiger Zunahme des Schlagvolumens und somit eine noch stärkere Erhöhung des Minutenvolumens. Die Maximalwerte der Frequenz, des Schlag- und Minutenvolumens, der systolischen Blutdrucksteigerung und die Erniedrigung des peripheren Strömungswiderstandes fallen mit den Minimalwerten der Anspannungs- und Austreibungszeit zusammen. Vorher steigt der periphere Strömungswiderstand an und das Schlag- und Minutenvolumen nimmt ab. In den folgenden 150 sec tritt mit Normalisierung der Pulsfrequenz, des Schlag- und Minutenvolumens, sowie des peripheren Strömungswiderstandes ein Rückgang der Verkürzungen der isometrischen und isotonischen Kontraktionsphase des Herzens ein.

Bei der Versuchsperson Hö. (Abb. 5) sehen wir in Übereinstimmung zu Abb. 4 beträchtliche Verkürzungen der Anspannungs- und Austreibungszeiten, deren Minimalwerte mit der maximalen Frequenzerhöhung zusammenfallen. Die Herzschlagfolge ist während des ganzen Versuches beschleunigt. Dieses Verhalten der Pulsfrequenz und die uns aus mehreren Versuchen bekannten Ruhewerte mehrerer Kreislaufanalysen, sowie die Reaktionsabläufe der physikalischen Kreislaufgrößen nach pharmakologischer Belastung deuten auf eine ausgesprochen „vagotone Grundeinstellung“ des Kreislaufs bei dieser Versuchsperson hin (siehe Abb. 2). Im Gegensatz hierzu sehen wir bei „sympathikotonem

Ruhekreislauf" nach Gabe von Sympathikomimetika in der gegenregulatorischen Phase fast immer ein beträchtliches Absinken der Pulsfrequenz unter den Ruheausgangswert (siehe Abb. 1, 3, 4, 6), (MECHELKE und MEITNER[17]). Der periphere adrenergische Effekt mit Senkung des peripheren Strömungswiderstandes ist besonders deutlich. Es erscheint uns wahrscheinlich, daß der vagotone Ruhekreislauf seinen schon in Ruhe erhöhten peripheren Widerstand stärker zu erniedrigen vermag als der „Sympathikotoniker". Abweichend zur Abb. 4 beobachten wir in diesem Versuch mit der maximalen Frequenzsteigerung keine Schlagvolumenzunahme. Die stärkere RR-Erhöhung und die andauernde Frequenzsteigerung, die wir bei Vagotonikern beobachten, deuten darauf hin, daß die Acceleranswirkung beim „Vagotoniker" stärker zur Auswirkung kommt als beim „Sympathikotoniker".

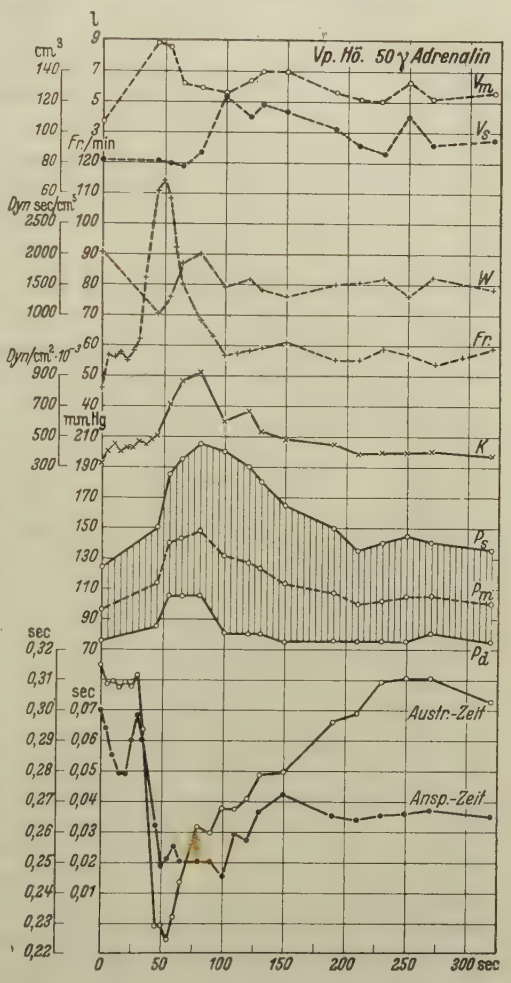


Abb. 5. Vp. Hö. i. v. Injektion von 50 γ Adrenalin Injektionsdauer: 20 sec. Vm = Minutenvolumen, Vs = Schlagvolumen, Fr = Pulsfrequenz, W = Periph. Strömungswiderstand, K = Volumelastizitätsmodul, Ps = Systolischer Blutdruck, Pd = Diastolischer Blutdruck, Pm = Mitteldruck, Ansp.-Z. = Anspannungszeit, Austr.-Z. = Austreibungszeit. — Zeit in Sekunden.

Der Reaktionsablauf der physikalischen Kreislaufgrößen bei der Versuchsperson Ba. (Abb. 6) zeigt eine frühzeitig einsetzende erhebliche Frequenzsteigerung, die mit einem Anstieg des Schlagvolumens bei gleichzeitiger Erniedrigung des peripheren Widerstandes einhergeht. In der pressorezeptorischen Gegenregulationsphase tritt eine deutliche Bradykardie auf. Der periphere Strömungswiderstand bleibt erniedrigt und das Schlag- und

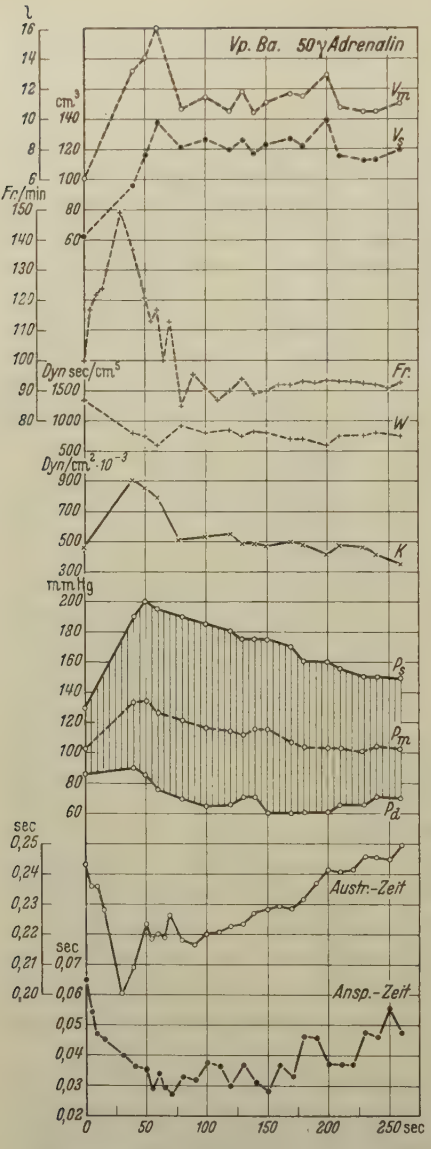


Abb. 6. Vp. Ba. i. v. Injektion von 50 γ Adrenalin Injektionsdauer: 20 sec. Vm = Minutenvolumen, Vs = Schlagvolumen, Fr = Pulsfrequenz, W = Periph. Strömungswiderstand, K = Volumelastizitätsmodul, Ps = Systolischer Blutdruck, Pd = Diastolischer Blutdruck, Pm = Mitteldruck, Ansp. Z. = Anspannungszeit, Austr. Z. = Austreibungszeit. — Zeit in Sekunden.

Minutenvolumen ist weiterhin erhöht. Der diastolische Blutdruck fällt ab bei Normalisierung des Volumelastizitätsmoduls. Die gleichbleibende Erhöhung des Schlagvolumens wurde von Stollreiter[8] mehrfach beobachtet. Er sieht die Ursache der Schlagvolumenplateaubildung in einer präkardialen Stauung, die vom Herzmuskel erst langsam bewältigt werden kann. In diesem Versuch läßt das Verhalten der physikalischen Kreislaufgrößen neben einer möglicherweise bestehenden präkardialen Stauung an eine Mehrfüllung des Herzens denken. Die Anspannungs- und Austreibungszeiten zeigen erhebliche Verkürzungen.

Die Adrenalinwirkung führt in allen Versuchen zu einer beträchtlichen Zunahme der Herzarbeit und darüber hinaus zu einer noch größeren Steigerung der Herzleistung. Aus der Tab. 1 sind die maximalen prozentualen Steigerungen der Herzarbeit und Herzleistung für diese Versuche ersichtlich.

Zusammenfassend können wir feststellen, daß die Veränderungen der physikalischen Kreislaufgrößen nach Adrenalin einen mehrphasischen Reaktionsablauf zeigen. Das unterschiedliche Verhalten der Zirkulationsgrößen in den einzelnen Versuchen wird verständlich, wenn wir berücksichtigen, daß der intakte Kreislauf in Abhängigkeit von der vegetativen Ausgangslage mit den ihm

Tabelle 1.

Vp.		Arbeit Pm · Vs %	Zeit sec	Leistung Pm · Vs / Systolendauer %	Zeit sec	%	Zeit sec	%	Zeit sec
He.	Max.	**261**	30			**368**	30		
Ba.	Max.	**215**	60			**294**	60		
Hö.	Max.	**160**	180	**165**	300	**187**	180	**185**	300
Ba.	Max.	**269**	60			**320**	60		
Hö.	Max.	**215**	100			**290**	100		
Her.	Max.	**176**	55			**266**	55		

zur Verfügung stehenden Reflexmechanismen der unphysiologischen Belastung zu begegnen sucht.

Neben diesem wechselnden Verhalten der physikalischen Kreislaufgrößen sehen wir in allen Versuchen während der ersten Minuten eine erhebliche Verkürzung der Anspannungs- und der Austreibungszeit. Die Minimalwerte der isometrischen und isotonischen Kontraktionsphase des Herzmuskels finden wir in mehreren Versuchen gleichzeitig mit der maximalen Frequenzsteigerung. Eine Frequenzsteigerung wirkt sowohl auf die isometrische als auch isotonische Kontraktionsphase des Herzmuskels verkürzend.

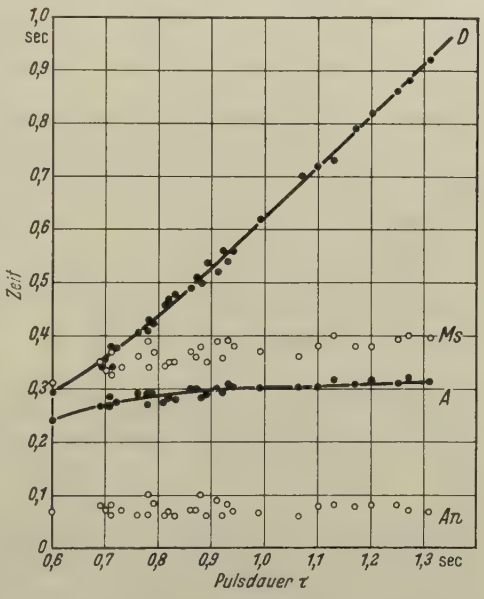


Abb. 7. Die Beziehung der ● Diastolendauer (D), ○ mechanischen Systolendauer (Ms), ● Austreibungszeit (A) und ○ Anspannungszeit (An) zur Pulsdauer (Normalwerte).

Zur Deutung der Verkürzungen der Anspannungs- und Austreibungszeit nach Adrenalin ist es demzufolge von Wichtigkeit, den Einfluß der Zunahme der Herzschlagfolge auf die Änderungen der Kontraktionsphasen zu untersuchen. Lauber[32] fand klare Beziehungen der Systolendauer und Diastolendauer zur Pulsdauer. Mit Zunahme der Frequenz nimmt sowohl die Systolendauer als auch die Diastolendauer ab. Die Abb. 7 soll die Beziehungen der Diastolendauer, mechanischen Systolendauer, Austreibungszeit und Anspannungszeit zur Pulsdauer, wie wir sie aus unseren Meßergebnissen bei mehreren normalen

Versuchspersonen erhalten haben, in einem Diagramm veranschaulichen. Da in unserem Diagramm die Diastolendauer die Differenz von Pulsdauer und mechanischer Systolendauer ist, erscheinen die Werte der Diastolendauer etwas verkürzt gegenüber denen von Lauber[32], der die Diastolendauer nach dem Verfahren von Broemser und Ranke errechnete (siehe Lauber, Abb. 28). Die Meßpunkte der mechanischen Systolendauer zeigen eine größere Streubreite, die durch das wechselnde Verhalten der Anspan-

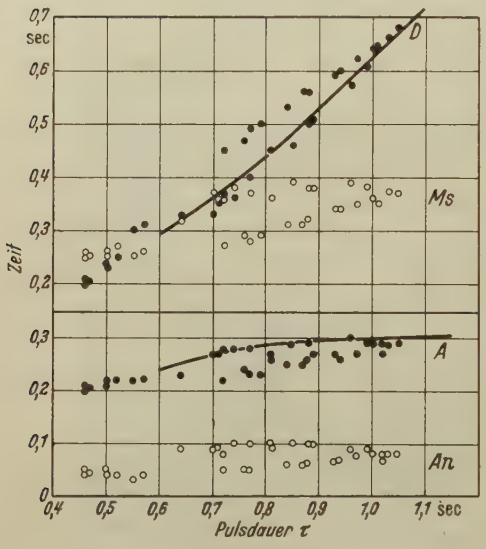


Abb. 8a.

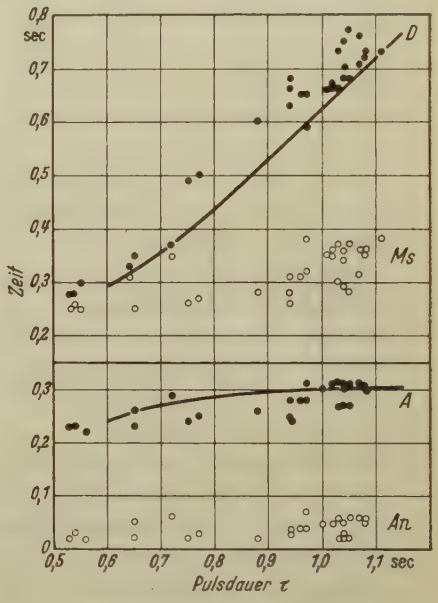


Abb. 8b.

Abb. 8a. Die Beziehung der ● Diastolendauer (D), ○ mechanischen Systolendauer (Ms), ● Austreibungszeit (A) und ○ Anspannungszeit (An) zur Pulsdauer nach Adrenalin (vgl. Abb. 4). Die Werte der Pulsdauer zwischen 0,4 und 0,6 sec entsprechen auf der Abb. 4 dem Zeitpunkt der maximalen Frequenzsteigerung von der 60. bis 80. sec nach Injektion. Mit Rückgang der Pulsfrequenz erfolgt relative Verkürzung der mechanischen Systolendauer, Austreibungs- und Anspannungszeit zur Pulsdauer.

Abb. 8b. Die Beziehung der Diastolendauer ● (D), ○ mechanischen Systolendauer (Ms), ● Austreibungszeit (A) und ○ Anspannungszeit (An) zur Pulsdauer (vgl. Abb. 5). Die Werte der Pulsdauer zwischen 0,5 und 0,6 sec entsprechen auf der Abb. 5 dem Zeitpunkt der maximalen Frequenzsteigerung von der 45. bis 55. sec nach Injektion (3 Meßpunkte). Mit Rückgang der Pulsfrequenz erfolgt relative Verkürzung der mechanischen Systolendauer, Austreibungs- und Anspannungszeit zur Pulsdauer.

nungszeit bedingt wird. Mit zunehmender Frequenz finden wir auch überwiegend kürzere Zeiten für die mechanische Systolendauer und die Anspannungszeit. Die Abb. 8a und 8b geben die Beziehungen der Diastolendauer, mechanischen Systolendauer, Austreibungs- und Anspannungszeit zur Pulsdauer nach Adrenalin wieder. In die Diagramme wurden alle Meßpunkte von Beginn der Injektion bis zum Ende der Registrierung eingetragen. In den ersten Sekunden bis zum Einsetzen der maximalen

Frequenzsteigerung entsprechen die zeitlichen Beziehungen den Normalwerten. Während der maximalen Frequenzsteigerung ist eine Beurteilung der Beziehungen der Diastolendauer, mechanischen Systolendauer, Austreibungs- und Anspannungszeit zur Pulsdauer nicht möglich, da wir in diesem Frequenzbereich über keine Ruhewerte verfügen. Mit dem Einsetzen des Pulsfrequenzrückganges dagegen sehen wir für zahlreiche Meßpunkte deutliche Verschiebungen der zeitlichen Beziehungen im Sinne einer relativen Verkürzung der mechanischen Systolendauer, der Austreibungszeit und der Anspannungszeit bei gleichzeitiger Verlängerung der Diastolendauer. Diese Veränderungen soll die Abb. 9 wiedergeben. In dieses Diagramm wurden die Meßpunkte der Versuche, welche die Abb. 4, 5 und 6 zeigen, die nach dem Frequenzmaximum bestimmt wurden, eingetragen (Abb. 4: 110—225 sec, Abb. 5: 60—150 sec, Abb. 6: 80—190 sec). Während dieser Zeitabschnitte können wir die relative Verkürzung der mechanischen Systolendauer, der Austreibungszeit und der Anspannungszeit bei Verlängerung der Diastolendauer feststellen. Vor und nach diesen Zeitabschnitten finden wir überwiegend der Frequenz entsprechende Beziehungen.

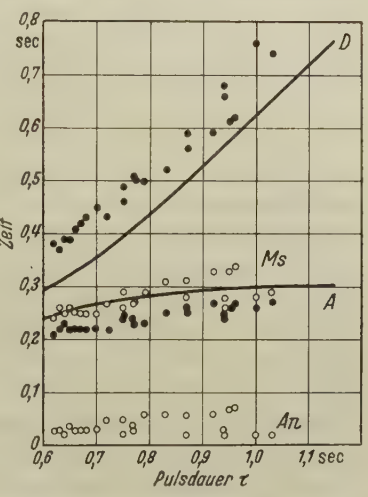


Abb. 9. Die Beziehung der ● Diastolendauer (D), ○ mechanischen Systolendauer (Ms), ◉ Austreibungszeit (A) und ◌ Anspannungszeit (An) zur Pulsdauer nach Adrenalin. Es wurden die Meßpunkte bestimmter Zeitabschnitte der Abb. 4, 5 und 6 eingetragen. Abb. 4: 110—225 sec, Abb. 5: 60—150 sec, Abb. 6: 80—190 sec.

Wir können somit feststellen, daß die Verkürzungen der Anspannungs- und Austreibungszeit nach Adrenalin nur in beschränktem Maße eine Folge der Pulsfrequenzänderungen sind.

Eine Verkürzung der Anspannungszeit ist als Folge peripherer Umstellungen bei normalem Herzmuskel immer dann zu erwarten, wenn bei Beginn der Herzkontraktion die Druckdifferenz zwischen Aorta und linkem Ventrikel klein ist. Dabei ist es gleichgültig, in welcher Weise dieser Endzustand erreicht wird. Eine Verkürzung der Austreibungszeit dagegen dürfte vor allem bei Abnahme des zu verschiebenden Blutquantums eintreten. Blumberger[18] faßt diese Abhängigkeit in folgende Sätze zusammen: „Je größer die Füllung und Anfangsspannung des Herzens, je geringer der Druckunterschied zwischen diastolischem Kammer- und Aortendruck, je größer die Herzkraft, desto kürzer ist die Anspannungszeit des Herzens. Je größer das Schlagvolumen, je höher die

peripheren Widerstände, je geringer die Dehnbarkeit im Windkesselbereich, desto länger ist die Austreibungszeit."

Für die Frage, in wie weit die hämodynamischen Umstellungen die Anspannungs- und Austreibungszeit beeinflussen, ist demzufolge die Kenntnis der Herzfüllung von wesentlicher Bedeutung. Die Änderungen der Ventrikelfüllung nach Adrenalingabe sind noch ungeklärt. Einmal liegt die Vermutung nahe, daß als Folge des vermehrten venösen Zustromes und der mit der Frequenzsteigerung einsetzenden sukzessiven Zunahme des Restvolumens während der Initialphase ein vermehrtes diastolisches Endvolumen zustande kommt, welches die Verkürzung der Anspannungszeit bedingen könnte.

Gegen die Annahme einer vermehrten Ventrikelfüllung sprechen aber die röntgenologischen Untersuchungen von Moritz[19], Dietlen[20], sowie von Reindell und Delius[21]. Sie konnten bei und nach Arbeitsbelastung ein Kleinerwerden des Transversaldurchmessers des Herzens und des Herzvolumens nachweisen. Da bei Muskelarbeit weitgehend die gleichen Kreislaufverhältnisse bestehen wie unter Adrenalineinwirkung (Deppe und Diefenhardt[13], sowie Deppe, Kapal und Kirchhoff[14]), erscheint uns eine Zunahme des Herzvolumens nach Adrenalin wenig wahrscheinlich. Unsere Annahme wird noch bestärkt durch die Froschversuche von Zamboni[22], der am spontan schlagenden Froschherzen unter Acetylcholinwirkung eine starke diastolische Erweiterung und unter Adrenalin die umgekehrte Wirkung beobachten konnte. In eigenen röntgenkymographischen Untersuchungen über die Größenänderung des Herzens nach pharmakologischer Belastung konnten wir nach Adrenalingabe eine Herzvergrößerung nicht feststellen.

Da das Verhalten der Anspannungs- und Austreibungszeit durch die Druck- und Volumenverhältnisse in den beiden Ventrikeln bestimmt wird, möchten wir ihre Veränderungen nach Adrenalin zur Deutung der von uns festgestellten Verkürzungen der isometrischen und isotonischen Kontraktionsphase des Herzens heranziehen. Im linken Ventrikel ist bei Zunahme des Schlagvolumens eine Zunahme der Druckdifferenz von diastolischem Ventrikel- und Aortendruck anzunehmen. Das Verhalten des linken Vorhofdruckes ist wechselnd (Hochrein und Matthes[23]). Selbst wenn wir eine Zunahme des diastolischen Ventrikeldruckes annehmen wollen, so dürfte diese in ihrem Ausmaß die diastolische Blutdruckerhöhung nicht ausgleichen können. Mit Zunahme der Druckdifferenz (Ventrikel-Aorta) wäre eine Verlängerung der Anspannungszeit zu erwarten. Bei größerem Schlagvolumen und erhöhtem diastolischen Blutdruck müßte eine längere Austreibungszeit resultieren.

Da wir in unseren Versuchen sowohl eine Verkürzung der isometrischen als auch isotonischen Kontraktionsphase des Herzmuskels finden, können wir diese nur mit einer Zunahme der Gesamtenergie des Herzmuskels

erklären. Wir möchten annehmen, daß eine direkte Adrenalinwirkung am Herzmuskel im Sinne einer Acceleransreizung zu einer positiven Inotropie führt. Es ist daher naheliegend anzunehmen, daß die Zunahme des Schlagvolumens nach Adrenalin auch durch eine Abnahme der physiologischen Restblutmenge ermöglicht wird. Dies ist um so wahrscheinlicher, wenn man mit REINDELL und DELIUS[21] und NYLIN[24] das Verhältnis von Schlagvolumen und Restblutmenge beim gesunden menschlichen Herzen auf 1 : 2 schätzt.

Die physiologischen Grundlagen der Herzmechanik wurden in jüngster Zeit von REICHEL[25] zusammenfassend dargestellt. REICHEL und BAUEREISEN[26] konnten die Verschiebung der isometrischen Maxima am isolierten Herzen bei gleicher Frequenz bei direkter Accelerans- und Vagusreizung feststellen. Unter diesen Bedingungen sahen sie keine Veränderung der Ruhedehnungskurve. E. und J. FREY[27] bestätigten diese Befunde bei Adrenalin und Azetylcholin-Einwirkung. Die nervös-hormonale Beeinflussung der kontraktilen Eigenschaften des Tierherzens unabhängig vom Ausgangsvolumen (positive oder negative Inotropie) ist somit eindeutig gesichert.

Während wir am linken Herzen sichere Aussagen über das Schlagvolumen und den Aortendruck in Verbindung mit den Zeiten der isometrischen und isotonischen Kontraktionsphasen machen konnten, können wir am rechten Herzen mit Sicherheit eine Zunahme des rechten Vorhofdruckes und somit des diastolischen Kammerdruckes annehmen. Da COURNARD[28] bei Zunahme des net diastolic filling pressure eine Erhöhung des Pulmonalis-Druckes findet, dürfte diese auch nach Adrenalin anzunehmen sein. Weiterhin kann auch eine Schlagvolumenzunahme des rechten Ventrikels angenommen werden, da länger dauernde Unterschiede der Auswurfmenge zwischen dem linken und rechten Herzen nicht wahrscheinlich sind. Eine positive Inotropie des rechten Ventrikels ist somit ebenfalls zu vermuten.

Da bei der Venendrucksteigerung eine Herzvergrößerung nicht nachgewiesen werden konnte bei gleichzeitigem Bestehen einer starken Frequenzzunahme, muß neben der Erhöhung der isometrischen Spannungsmaxima und isotonischen Kontraktionsmaxima an eine Erhöhung des Elastizitätsmoduls des Herzmuskels gedacht werden. Die Beziehungen der Diastolendauer, mechanischen Systolendauer, Austreibungs- und Anspannungszeit zur Pulsdauer entsprechen bei maximaler Frequenzsteigerung nach Adrenalin überwiegend den der Zunahme der Herzschlagfolge entsprechenden Normalzeiten (siehe Abb. 7, 8, 9). Die Verkürzung der Kontraktionsphasen des Herzmuskels dürften demzufolge bei Überschreitung einer „kritischen Frequenz" die Folge der mit der Frequenzsteigerung wirksam werdenden Relaxation und damit der Versteilerung der Ruhedehnungskurve sein. Die maximalen Verkürzungen der isometrischen und isotonischen Kontraktionsphase des Herzens zum Zeitpunkt der maximalen Frequenzsteigerung würden vielleicht indirekt auf die Abhängigkeit der Tonotropie von der Frequenzerhöhung schließen

lassen. Erst mit Einsetzen des Frequenzrückganges dürfte die Inotropie voll wirksam werden und die Volumenarbeit des Herzens erhöhen.

Reindell und Delius[21] erklären in gleicher Weise die Arbeitsbedingungen des menschlichen Herzens während und nach Mehrarbeit. Während sie bei stationären Arbeitsbedingungen eine erhöhte Dehnung annehmen, glauben sie an eine Erhöhung des Herzelastizitätsmoduls während und nach Mehrarbeit. Auf Grund ihrer Untersuchungen über die Herzdynamik beim gesunden Menschen kommen sie zu der Feststellung, „daß die Kontraktionsarbeit des gesunden menschlichen Herzens relativ unabhängig vom Herzvolumen durch Vaguseinfluß gehemmt, durch Sympathikuseinfluß gefördert werden kann". Sie erklären dieses scheinbar widerspruchsvolle Verhalten mit einer Veränderung der Elastizität des Herzmuskels entweder durch den Einfluß der Herznerven und Hormone oder durch noch nicht erkannte Veränderungen des Feinbaues und der kolloidalen Struktur der Muskelelemente. Reichel[29] konnte bei Frequenzsteigerung eine Änderung des Volumelastizitätsmoduls nachweisen. Er findet die positive Tonotropie frequenzgebunden im Gegensatz zur positiven Inotropie. Wenn O. Frank annimmt, daß die isotonischen und isometrischen Minima des tätigen Herzens höher liegen als die des ruhenden Herzens, so dürfte zu vermuten sein, daß bei beträchtlicher Frequenzsteigerung die Minima noch weiter nach oben verschoben werden. Die Frequenzsteigerung dürfte zu einem zunehmend größer werdenden Kontraktionsrückstand führen, der die Diastole unvollständig werden läßt. Beim Frosch wurde diese kritische Frequenz von Eismayer und Quincke[30] mit 40—60 pro Minute und von Broemser[31] mit 86 pro Minute angegeben. Beim Menschen soll sie nach Broemser 96 Schläge pro Minute betragen.

Die ursächlich noch wenig bekannten Faktoren, die zur Änderung der elastischen Eigenschaften des Herzmuskels führen, dürften am Muskelelement selbst Veränderungen hervorrufen.

Reichel[25] weist darauf hin, daß man aus dem elastischen Verhalten des ruhenden, nicht tätigen Herzens die Mechanik des schlagenden Herzens voraussagen kann. Die im Muskelelement erzeugte elastische Energie der inneren Dehnung während der isometrischen Kontraktion ist abhängig von dem Ausmaß der Verkürzung der kontraktilen Komponente. Sie stellt die gesamte Energie dar, die der Herzmuskel bei einem bestimmten Ausgangszustand im Maximum der Kontraktion zu entwickeln vermag. Mit Zunahme der Herzfüllung wird durch Dehnung der beiden Komponenten des Muskelelementes für die Kontraktion des kontraktilen Abschnittes desselben eine vermehrte Gesamtenergie gewonnen. Bei der positiven Inotropie kann sich die kontraktile Komponente stärker verkürzen bei gleichzeitig größerer Dehnung des nicht kontraktilen, nur elastischen Anteiles. Die größere Gesamtenergie für die vermehrte Kontraktion des aktiven kontraktilen Abschnittes des Muskelelementes wird durch den hormonalen Einfluß des Adrenalins oder durch Acceleransreizung gewonnen.

Bei positiver Tonotropie dürfte es nur dann zu einer erhöhten Gesamtenergieentwicklung kommen, wenn durch gleichzeitig erhöhten Venendruck eine Verkleinerung des Herzens verhindert wird und eine gleiche Füllung zustande kommt und somit das Muskelelement seine gleiche Länge behält. Der sonst bei Erhöhung des Venendruckes durch erhöhte Vordehnung eintretende Energiegewinn wird somit bei Bestehen einer Tonotropie ohne Zunahme des diastolischen Volumens erreicht. Jede Zunahme der Gesamtenergie des Herzens kann grundsätzlich sowohl in

der isometrischen als auch isotonischen Kontraktionsphase des Herzens veranlagt werden.

Da bei Zunahme des Volumelastizitätmoduls eine Versteilerung der Ruhedehnungskurve erfolgt, wird der Ausgangspunkt der Herzmuskelkontraktion dem Punkt des diastolischen Blutdruckes näher gerückt. Der positiven Tonotropie müßte demzufolge die von Bohnenkamp[33] beschriebene Klinotropie zuzuordnen sein, wenn eine gleiche Ventrikelfüllung erfolgt und somit der diastolische Kammerdruck ansteigt. Bauereisen und Reichel[26] erweiterten den Begriff der Inotropie, indem sie außer einer Änderung der Zuckungshöhe auch eine solche der Kontraktionszeiten in diesen einschließen. Sie glauben die Klinotropie in die Inotropie einordnen zu können auf Grund der bei beiden Vorgängen einsetzenden Versteilerung der Kurven der isometrischen Maxima. Dabei nehmen sie eine konstante Ruhedehnungskurve an. Bei positiver Tonotropie kann jedoch auch bei gleichbleibender Zuckungshöhe eine Beschleunigung der Kontraktion erfolgen bei Anstieg des diastolischen Kammerdruckes.

Der inotrope Energiegewinn des Herzmuskels führt vor allem zu einer Vergrößerung des Schlagvolumens (der Masse). Bei Tonotropie und gleichzeitiger Erhöhung des diastolischen Kammerdruckes jedoch dürfte die höhere Energieentwicklung vorwiegend eine Zunahme der Beschleunigung bei wenig veränderter Masse bedingen. Bei gleichzeitigem Bestehen von positiver Inotropie und Tonotropie und unveränderter Herzfüllung (Anstieg des diastolischen Kammerdruckes) ist es wahrscheinlich, daß beide sich bis zu einem gewissen Grade ihrer Wirkung addieren, daß aber mit stärker werdender Tonotropie diese die Volumenarbeit der Inotropie einschränkt. Einen Hinweis dafür könnte die Abb. 5 geben, wo bei der besonders starken Frequenzerhöhung das Schlagvolumen nicht ansteigt.

Zusammenfassend können wir sagen, daß:

1. die positive Inotropie, die nach Adrenalin und Acceleransreizung am isolierten Herzen erwiesen ist, auch beim menschlichen Herzen wirksam wird,

2. die Adrenalinwirkung in Verbindung mit einer starken Frequenzsteigerung zu einer Änderung des Elastizitätsmoduls des Herzmuskels führen dürfte,

3. positive Inotropie und Tonotropie dürften die Verkürzungen der Zeiten der Herzdynamik bedingen.

Während in der Initialphase vorwiegend eine Tonotropie und positive Inotropie wirksam wird, müssen die Verkürzungen der Anspannungs- und Austreibungszeit in der gegenregulatorischen Phase neben einer noch bestehenden Inotropie als Folge der hämodynamischen Umstellung und der damit verbundenen Veränderung der Herzfüllung aufgefaßt werden. In der 3. Phase werden die Verkürzungen der isometrischen und isotonischen Kontraktionsphase des Herzens vorwiegend durch Füllungsänderungen nfolge Umstellung der physikalischen Kreislaufgrößen bedingt.

Zusammenfassung.

Bei 5 herzgesunden Versuchspersonen wurden die physikalischen Kreislaufgrößen und die Herzdynamik nach intravenöser Injektion von 50 γ Adrenalin bestimmt. Während ein unterschiedlicher Regulationsablauf der physikalischen Kreislaufgrößen beobachtet wird, werden die Zeiten der Herzdynamik in allen Versuchen erheblich verkürzt.

Diese Verkürzungen der isometrischen und isotonischen Kontraktionsphase des Herzens können nur mit einer Gesamtenergiezunahme des Herzmuskels erklärt werden, die in beiden Kontraktionsphasen veranlagt wird. Mit Sicherheit kann eine direkte Herzwirkung des Adrenalins im Sinne einer positiven Inotropie angenommen werden. Während der maximalen Frequenzsteigerung ist eine Zunahme des Elastizitätsmoduls des Herzmuskels wahrscheinlich.

Literatur.

[1] Rein, H.: Verh. dtsch. Ges. Kreislaufforschg **27** (1937). — [2] Gollwitzer-Meier, Cl.: Z. exper. Med. **69**, 377 (1930). — [3] Rein, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **187**, 617 (1937). — [4] Matthes, K.: Kreislaufuntersuchungen mit fortlaufend registrierenden Methoden am gesunden Menschen. Stuttgart: Thieme-Verlag. Im Druck. — [5] Euler u. Liliestrand: Scand. arch. Physiol. (D) **55**, 1 (1929). — [6] Wezler, K., u. A. Böger: Erg. Physiol. **41**, 292 (1939). — [7] Wezler, K.: Pflügers Arch. **244**, 622 (1941). — [8] Stollreiter, H.: Dtsch. Arch. klin. Med. **193**, 403 (1948). — [9] Sack, H., u. A. Bernsmeier: Klin. Wschr. **305** (1949). — [10] Jarisch: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **139**, 257 (1929). — [11] Grollmann u. Baumann: Schlagvolumen und Zeitvolumen des gesunden und kranken Menschen. Dresden-Leipzig: Steinkopf-Verlag 1935. — [12] Hartel u. Bonsmann: Z. klin. Med. **120**, 549 (1932). — [13] Deppe, B., u. H. Diefenhardt: Z. f. Kreislaufforschg **31**, 1 (1939). — [14] Deppe, B., E. Kapal, u. H. Kirchhoff: Z. f. Kreislaufforschg **32**, 1 (1940). — [15] Mechelke, K., u. E. Nusser: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (im Druck). — [16] Böger, A., B. Deppe, u. K. Wezler: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **189**, 480 (1938). — [17] Mechelke, K., u. H. J. Meitner: Arch. f. Kreislaufforschg (im Druck). — [18] Blumberger, Kj.: Arch. f. Kreislaufforschg **6**, 203 (1940). — [19] Moritz: Münch. med. Wschr. **713**, 1331 (1908). — [20] Dietlen: Handb. norm. u. path. Physiol. VII/1, 506. — [21] Reindell, H., u. L. Delius: Dtsch. Arch. f. klin. Med. **193**, 639 (1948). — [22] Zamboni: Zit. nach E. u. J. Frey. — [23] Hochrein, M., u. K. Matthes: Pflügers Arch. **233**, 1 (1933). — [24] Nylin: Zit. nach K. Matthes. — [25] Reichel, H.: Klin. Wschr. **1** (1946). — [26] Bauereisen, E., u. H. Reichel: Klin. Wschr. **785** (1947). — [27] Frey, E. u. J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 590 (1948). — [28] Lawson, Bloomfield u. Cournard: Amer. J. Med. **1**, 315 (1946). — [29] Reichel, H.: mündl. Mitteilung. — [30] Eismayer u. Quincke: Zit. nach E. u. J. Frey. — [31] Broemser: Verh. dtsch. Ges. Kreislaufforschg **269** (1939). — [32] Lauber, H.: Erg. inn. Med. u. Kinderheilk. **44**, 678 (1932). — [33] Bohnenkamp: Pflügers Arch. **196**, 279 (1922).

Dr. K. Mechelke, Erlangen, Med. Univ. Klinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 281—288 (1950).

Aus der I. Med. Univ. Klinik in Wien (Vorstand: Prof. Dr. E. Lauda).

Zur Wirkung von Dinitrokresol und Thiouracil auf den Zellstoffwechsel.

Von

A. Locker, H. Siedek und K. H. Spitzy.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. November 1949.)

Die Senkung der allgemeinen Stoffwechselsteigerung bei Dinitro-ortho-kresoleinwirkung durch Thiourazil[1, 2] legte eine Untersuchung dieser beiden Substanzen in ihrer Wirkung auf den Zellstoffwechsel nahe. Es konnte dabei der bereits weitgehend aufgeklärte Wirkungsmechanismus von Dinitrophenolderivaten (DN) und Thiourazilverbindungen (ThU) als Grundlage zum Verständnis ihrer gegenseitigen Stoffwechselbeeinflussung dienen.

In vitro wurde durch DN von zahlreichen Autoren bei den verschiedensten Geweben und Organismen mit geeigneten Konzentrationen eine Steigerung der Atmung, der aeroben und der anaeroben Glykolyse gefunden[3–22]. Diese Steigerung des Kohlenhydratabbaues läßt 3 Hauptangriffspunkte erkennen:

1. Förderung der anoxydativen Phase: Die Glykolyse wird beschleunigt[23] und ihre Induktionszeit verkürzt[24, 25]. Die Hydrolyse von Kreatinphosphat[26, 27] und der Adenosinphosphorsäuren[27] wird gesteigert, der Verbrauch an anorganischem Phosphat nimmt zu[24, 28]. In einem Homogenatsystem, welches Phosphorylierung und Oxydation koppelt, scheint Dinitrophenol (DNP) eine Art Ersatzfunktion für das anorganische Phosphat ausüben zu können[29]. Die assimilatorische Aufbauphase wird durch DNP gehemmt[30, 31, 32].

2. Beeinflussung des C_4-Dikarbonsäurezyklus: Durch Malonat wird die DN-Wirkung auf die Atmung spezifisch gehemmt. Es ergibt sich daraus die maßgebliche Beteiligung der Umwandlung von Succinat in Fumarat an der Atmungssteigerung[33].

Die von anderer Seite[34] festgestellte Hemmung der Succinodehydrase dürfte auf die Verwendung von Methylenblau als H_2-Akzeptor und andere Konzentration von DN zurückzuführen sein.

Die Umwandlung von Malat zu Pyruvat wird gehemmt[34–36], besonders stark[24] in der Verbindung mit der Dekarboxylierung, während die einfache Dehydrierung von Malat zu Oxalazetat eher gesteigert ist[36].

3. Aktivierung im Cytochromsystem: Die Atmungssteigerung durch DN ist CN- und CO-empfindlich[37, 39, 8, 10, 15]. Die Reduktion von Cytochrom wird durch Dinitrokresol (DNOC) stark beschleunigt[38].

Diese Wirkungen auf den Zellstoffwechsel werden durch DN-Konzentrationen um 10^{-5} m erzielt. Sie werden in ihrer Gesamtheit auf Enthemmung eines mit der Integrität der Zellstruktur in Zusammenhang stehenden Enzymregulators zurückgeführt. Homogenate zeigen die beschriebenen Steigerungen nicht, und die maximale Atmung der intakten Gewebe nach DN erreicht gerade die Höhe der Homogenatatmung[40, 41]. Wird die Konzentration auf Werte um 10^{-3} m erhöht, tritt allgemein hemmender Effekt auf[9, 24, 29, 34, 41–44], wobei die Phosphorylierung empfindlicher als die Atmung betroffen wird[29, 45].

Die zu diesen Untersuchungen am häufigsten verwendete Substanz ist das 2,4-Dinitrophenol, das in seiner Wirkung von 4,6-DNOC übertroffen wird, wobei aber keine spezifisch qualitativen Unterschiede bestehen[46]. Für die Wirkung ist die Parastellung einer Nitrogruppe notwendig[47]. Die Einführung von Kohlenwasserstoffen bis zum Pentyl steigert die Wirksamkeit[48], während eine dritte NO_2-Gruppe, eine NH_2- oder HSO_3-Gruppe diese weitgehend abschwächt[49].

Die bisherigen Ergebnisse der Untersuchungen über die Wirkung des *Thiouracils* sind weniger einheitlich. Es wurden sowohl Organe von ThU behandelten Tieren, als auch normaler Tiere mit ThU-Zusatz in vitro untersucht. Es zeigte sich auch hier eine Konzentrationsabhängigkeit der Art der Wirkung und außerdem ein wesentlicher Einfluß der Einwirkungsdauer. Zum Unterschied von der DN-Wirkung scheint bei der ThU-Wirkung eine deutlichere Organspezifität vorzuliegen. Möglicherweise sind darauf die Unterschiede der Resultate zurückzuführen. Es ergab sich bei Knochenmarkszellen[50], Leber und Schilddrüse[51–54] mäßige Hemmung der Atmung, von anderer Seite wurde bei Schilddrüse[55, 56], bei Hirn- und Lungengewebe[57], sowie bei Seeigeleiern[58] kein nennenswerter Unterschied gegenüber der Normalatmung, zum Teil auch der Glykolyse festgestellt.

Bei geringen Konzentrationen wurde Steigerung des Sauerstoffverbrauches gefunden[59, 60]. Nach Behandlung von Ratten mit ThU wurde der Stoffwechsel von Leber und Niere herabgesetzt[52], während Schilddrüse erhöhte Atmung zeigte[52, 61]. Zugleich war die Succinoxydaseaktivität der Leber[62] und der Cytochrom C-Gehalt der Muskulatur herabgesetzt[63]. In bezug auf die Cytochromoxydase sind die Ergebnisse nicht einheitlich, teils wird Hemmung[64, 65], teils Wirkungslosigkeit bei gleichem Substrat auch in vitro beschrieben[66, 67]. Die atmungssteigernde Wirkung von ThU lag bei der Konzentration um 10^{-3} m, die hemmende um 10^{-2} m und höher.

Material und Methode.

Die Untersuchungen wurden an menschlichen Lymphozyten einer chronisch lymphatischen Leukämie und an Leberschnitten normaler Ratten durchgeführt. Die Lymphozyten zeigten höchstens 20% jugendliche Formen und wurden unter

möglichster Schonung durch Sedimentierung in Heparinplasma (10 mg%) und Abpipettieren der Leukozytenschichte gewonnen. Davon wurden 2 cc in 8 cc 0,025 m Bikarbonat-RINGER-Lösung (plus 0,2% Glukose) suspendiert. Pro mm^3 etwa 50000 Zellen. Q wurde auf 2.10^7 Zellen bezogen, entsprechend etwa 1 mg Trockengewicht (in Übereinstimmung mit [68]). Leberschnitte wurden unter Berücksichtigung der Grenzschnittdicke weitgehend aseptisch geschnitten, Trockengewichte um 10 mg. Verwandt wurde die indirekte Methode nach WARBURG[69] mit 95% O_2 und 5% CO_2 für aeroben und 95% N_2 plus 5% CO_2 für anaeroben Gaswechsel. 120 Exkursionen pro Minute, 37,5° C; p_H nach HASSELBALCH 7,42 erwies sich bei unmittelbar nach dem Versuch durchgeführter Kontrolle als konstant. 10^{-3} m 4-Methyl-Thiouracil in n/200 NaOH, (n/200 NaOH hat auf den Stoffwechsel keinen Einfluß[70]), gelöst für die Lymphozytenversuche, bzw. 2.10^{-2} m 4-Methyl-Thiouracil-Natrium in RINGER-Lösung für die Leberversuche, wurden vor Beginn zugesetzt. Ablesungen viertelstündlich bis stündlich. Nach 1 —3 Std wurde 4,6-Dinitro-o-Kresol 10^{-5} m Endkonzentration zugekippt. Gesamtdauer bis 12 Std. Zahl der Einzelversuche: 33 für Lymphozyten, 16 für Leber.

Ergebnis.

In Übereinstimmung mit den erwähnten Untersuchungen[3–22] findet sich bei den leukämischen Leukozyten sowie bei den Leberschnitten normaler Ratten ein starker Anstieg des O_2-Verbrauches nach 10^{-5} m DNOC. Er betrug bei den Lymphozyten etwa 100% (QO_2 6,2 auf 12,8) mit Maximum nach 1 Std (Abb. 1), bei der Leber etwa 350% (QO_2 6,0 auf 28,3) mit Maximum nach 3 Std (Abb. 3). Dieser Anstieg ist bei den Lymphozyten nach vorheriger Zugabe von 10^{-3} m ThU um etwa 50% (QO_2 max. 12,8 auf 9,8), unter Berücksichtigung des Atmungsanstieges nach ThU um 80%, bei Leber mit $2{,}10^{-2}$ m ThU um etwa 40% (QO_2 max. 28,3 auf 19,4) zu senken. Gleichzeitiges Einkippen der beiden Substanzen zeigt diese Wirkung nicht. Mit der Steigerung des O_2-Verbrauches nach DNOC geht ein charakteristisches Absinken der CO_2-Produktion einher (scheinbarer RQ bei Lympho.: 1,07 auf 0,76, bei Leber: 0,78 auf 0,43), dessen Minimum etwas hinter dem Maximum der Atmung zurückbleibt. Diese Senkung der CO_2-Bildung ist durch ThU nicht nennenswert zu beeinflussen. Die bei den Lymphozyten angewandte Konzentration von ThU bewirkt eine geringe Steigerung der Atmung (QO_2 von 8,7 auf 9,4), und die ohne Zusatz auftretende geringe aerobe Glykolyse verschwindet, ebenso ist sie nach Zusatz von DNOC nicht mehr nachzuweisen (Abb. 2).

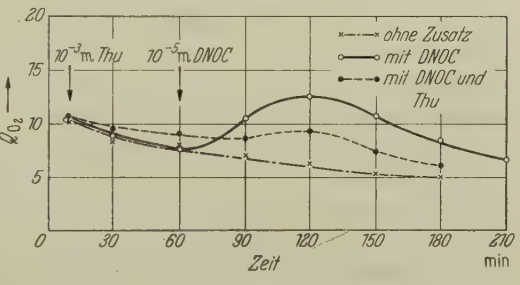


Abb. 1. Wirkung von DNOC und ThU auf die Atmung leukäm. Lymphozyten.

Die anaerobe Glykolyse wird bei den angewandten Konzentrationen durch ThU geringgradig, d. h. etwa 10% ($Q_{CO_2}^{N_2}$ Lympho. 20,1 auf 18; Leber $Q_{CO_2}^{N_2}$ 1,8 auf 1,5) gesenkt. DNOC zeigt kaum steigernde Wirkung (Werte innerhalb der Fehlergrenze), und in der kombinierten Wirkung von ThU und DNOC ist keine Veränderung feststellbar. Die bei der Leber verwendete ThU-Konzentration senkt den O_2-Verbrauch ab (QO_2 8,1 auf 7,4).

Diskussion.

Wie aus der angegebenen Literatur und unseren Untersuchungen eindeutig hervorgeht, ist eine periphere, direkt am Zellstoffwechsel angreifende Wirkung des DNOC nachweisbar, die sich in einer starken Atmungssteigerung ausdrückt. Hinsichtlich der peripheren Wirkung des ThU sind die Angaben der Literatur nicht einheitlich. Die allgemeine Stoffwechselsenkung in vivo durch ThU wurde von den ersten Untersuchern zunächst nur auf eine Hemmung der Thyroxinsynthese bezogen (Literatur siehe [72]), später aber auch als eine peripher antagonistische Wirkung auf das Thyroxin erkannt[71, 72]. Die Uneinheitlichkeit der Ergebnisse bei den Untersuchungen der direkten Beeinflussung des Zellstoffwechsels durch ThU mögen auf die Verschiedenheit der Gewebe, der angewandten Konzentrationen und der Dauer der Versuche zurückzuführen sein. Um für unsere Untersuchungen erfolgversprechende Bedingungen zu erreichen, verwendeten wir Lymphozyten, weil bekannt ist, daß ThU nach peroraler Applikation von Blutleukozyten besonders reichlich aufgenommen wird[73]. Die bei der Leber angewandte höhere ThU-Konzentration, die für eine deutlich hemmende Wirkung gegenüber der DNOC-Steigerung erforderlich war, ließ den Stoffwechsel eher absinken, während die niedrigere Konzentration bei Lymphozyten eine geringe Steigerung verursachte. Es ließ sich also in unseren Versuchen eine, wenn auch geringe, direkte Wirkung des ThU auf den Zellstoffwechsel wahrscheinlich machen. Eine besondere Verdeutlichung dieser Wirkung ergibt sich jedoch bei der Kombinierung von ThU mit DNOC, die sich in einem dem ThU-Thyroxin ähnlichen, peripheren Antagonismus ausdrückt. Dieser wird besonders in den Untersuchungen mit Lymphozyten klar, addiert sich doch bei diesen die durch ThU erwirkte Atmungssteigerung nicht zu jener nach DNOC-Zugabe. Es hat vielmehr DNOC nach ThU eine geringere atmungssteigernde Wirkung als ohne Vorbehandlung.

Die nach den Angaben der Literatur nach DNOC eher zu erwartende Förderung der Glykolyse trat nur zum Teil ein. Die hohe anaerobe Glykolyse der Lymphozyten war nur wenig, die geringe anaerobe Glykolyse der Leber überhaupt nicht gesteigert. Es dürfte sich hierbei um eine größere Empfindlichkeit der Glykolyse im Vergleich zur Atmung gegen-

über bestimmten höheren Konzentrationen handeln[24, 25], wie auch für die Phosphorylierung eine Abnahme des Verbrauchs an anorganischem Phosphat bei gleichzeitiger Atmungssteigerung nach DNP gefunden wurde[29]. Auch mit den typischen Glykolyseinhibitoren, wie Fluorid, Oxalat und Jodazetat ist bei aerob glykolysierenden Geweben mit ge-

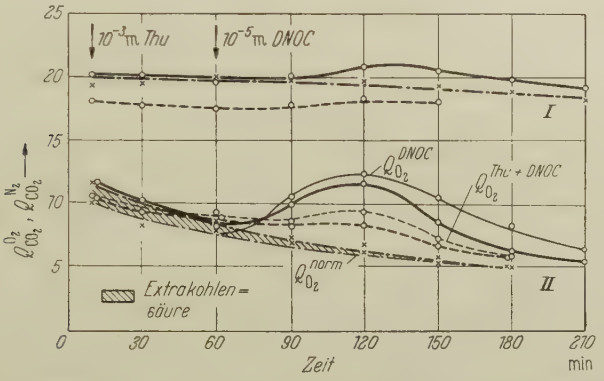


Abb. 2. Wirkung von DNOC und ThU auf die anaerobe (I) und aerobe Glykolyse (II) von Lymphozyten (QO_2-Werte mitgezeichnet).

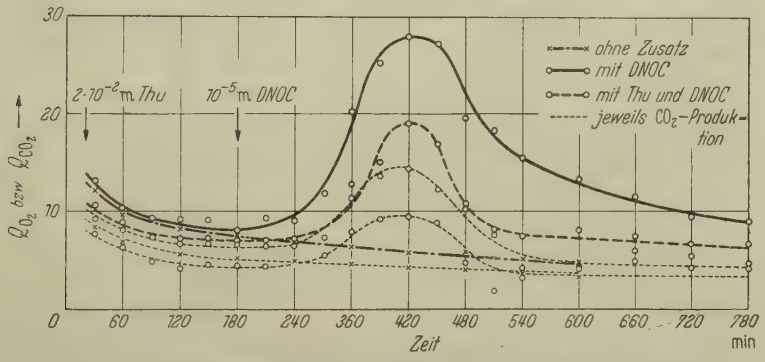


Abb. 3. Wirkung von DNOC und ThU auf die Atmung der normalen Rattenleber.

eignetem Substrat und entsprechenden Konzentrationen eine Atmungssteigerung erzielt worden[74]. Eine ähnliche Steigerung des Sauerstoffverbrauchs konnte mit geringen Urethankonzentrationen bei leukämischen Leukozyten bei gleichzeitiger Hemmung der aeroben und anaeroben Glykolyse gefunden werden[75]. Das ThU scheint sich in seiner Wirkung auf die Atmung gleichartig zu verhalten. Es senkte gering die anaerobe Glykolyse und zur selben Zeit setzte ein geringer, aber bemerkenswerter Anstieg der Atmung ein. Bei der gemeinsamen Einwirkung von ThU und DNOC blieb die anaerobe Glykolyse praktisch auf gleicher Höhe.

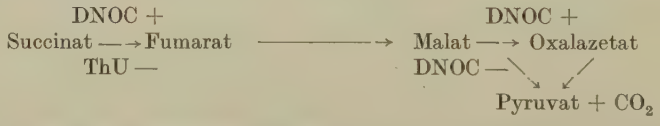
Beim Verschwinden der aeroben Glykolyse durch DNOC kann ein einfacher Pasteureffekt angenommen werden, da hier die anaerobe Glykolyse nicht nennenswert beeinflußt ist.

Das Absinken der CO_2-Produktion, beziehungsweise des scheinbaren RQ über das Verschwinden der aeroben Glykolyse hinaus läßt die Annahme zu, daß der wahre RQ auf DNOC, unbeeinflußt durch ThU, herabgesetzt wird, wovon nur wenige Beobachtungen vorliegen[4]. (Auch bei der DN-Vergiftung in vivo sinkt der CO_2-Gehalt des Blutes ohne Veränderung der Alkalireserve ab[76].) Das Absinken der CO_2-Produktion könnte auf die Dekarboxylierungshemmung bezogen werden. Die Verminderung der CO_2-Abgabe aus der Suspensionsflüssigkeit durch Milchsäureschwund[77] ist wenig wahrscheinlich, da unter DNOC eine Beeinträchtigung der Assimilation, resp. Resynthese gefunden worden ist[2, 27, 30–32, 43, 78].

Abschließend kann versucht werden, vom Mechanismus der antagonistischen Wirkung des ThU gegenüber dem DNOC, wie er bei den von uns verwendeten Konzentrationen vorliegt, ein zusammenfassendes Schema zu entwerfen, gegliedert nach den 3 Hauptangriffspunkten der DNOC-Wirkung.

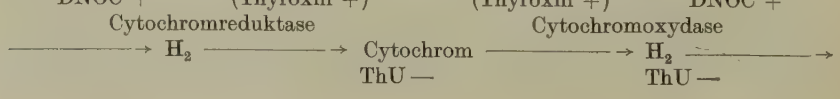
1. Ein hemmender Einfluß des ThU auf die Beschleunigung der anoxydativen Abbauphase durch DNOC ist wahrscheinlich, um so mehr als auch in vivo bei ThU im Gegensatz zu DN eine Leberglykogenzunahme gefunden wurde[2, 79].

2. Durch die ThU-Hemmung der Succinoxydase im C_4-Dikarbonsäurezyklus ist ein gemeinsamer Angriffspunkt mit DNOC gegeben, das an diesem Punkte fördernd eingreift:



Die Dekarboxylierungshemmung durch DNOC scheint nach unseren Ergebnissen von ThU nicht beeinflußbar zu sein.

3. Während der Antagonismus Thyroxin-ThU als gegensätzliche Wirkung auf Cytochromoxydase und Cytochrom C beschrieben wird[62, 63], liegt der Angriffspunkt des DNOC neben einer Steigerung der Cytochromoxydase in der Beschleunigung der Cytochromreduktaseaktivität[38], wobei Cytochrom C nicht beeinflußt ist[80]. Diese Beschleunigung wird durch ThU-Hemmung der Cytochromoxydase ausgeglichen.



Zusammenfassung.

An leukämischen Lymphozyten vom Menschen und Leberschnitten von normalen Ratten wurde Sauerstoffverbrauch, aerobe und anaerobe Glykolyse nach WARBURG unter Zusatz von 4-Methyl-Thiourazil-(Na) und 4,6-Dinitro-o-kresol bestimmt.

Die Zellstoffwechselsteigerung durch Dinitrokresol wird durch Thiourazil herabgesetzt. Der konzentrationsabhängige Wirkungsmechanismus beider Substanzen wird diskutiert.

Literatur.

[1] BARKER, S. B.: Endocrinology **39**, 234 (1946). — [2] HOFMANN-CREDNER, C., u. H. SIEDEK: Klin. Med. **4**, 361 (1949). — [3] RONZONI, E., u. E. EHRENFEST: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **31**, 318 (1933). — [4] MUNTWYLER, E.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **31**, 621 (1934). — [5] MCCORD, W. M.: Am. J. Physiol. **109**, 232 (1934). — [6] POURBAIX, Y.: C. R. Soc. Biol. Paris **115**, 1405 (1934). — [7] DODDS, E. C., u. G. D. GREVILLE: Lancet **1934** I. 398. — [8] CLOWES, G. H. A., u. M. E. KRAHL: J. of biol. Chem. **109**, XXI (1935). — [9] PLANTEFOL, L.: Ann. de Physiol. **11**, 32 (1935). — [10] BODINE, J. H., u. E. J. BOELL: J. cell. a. comp. Physiol. **11**, 41 (1938). — [11] BOELL, E. J., J. NEEDHAM, u. V. ROGERS: Proc. roy. Soc. London B **127**, 322 (1939). — [12] MARKOVIC, L.: Bull. Acad. Sci. math. et natur. Sci. **5**, 194 (1939); Ref. Ber. Physiol. **122**, 505 (1941). — [13] FUKUGITA, S.: Mitt. med. Akad. Kyoto **28**, 663 (1940); Ref.: Ber. Physiol. **121**, 429 (1940). — [14] BURRIS, R. H., u. P. W. WILSON: J. cell. a. comp. Physiol. **19**, 361 (1942). — [15] DE MARCHIN, P.: Bull. Soc. roy. Sci. Liege **11**, 70 (1942). — [16] LARDY, H. A., u. P. H. PHILLIPS: J. of biol. Chem. **149**, 177 (1943). — [17] LARDY, H. A., B. WINCHESTER, u. P. H. PHILLIPS: Arch. Biochem. **6**, 33 (1945). — [18] LARDY, H. A., R. G. HANSEN, u. P. H. PHILLIPS: Arch. Biochem. **6**, 41 (1945). — [19] DE LUCA, G., u. A. TROJANIELLO: Boll. soc. ital. biol. sper. **22**, 811 (1946). — [20] GIESE, A. C., u. W. H. SWANSON: J. cell. a. comp. Physiol. **30**, 283 (1947). — [21] JAMES, H. P., H. W. ELLIOTT, u. E. W. PAGE: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **67**, 130 (1948). — [22] CRANE, R. K., u. A. G. KELTCH: J. gen. Physiol. **32**, 509 (1949). — [23] JAKOVLEV, N. N.: Byull. Eksbtl. Biol. Med. **14**, 42 (1942): Ref.: Chem. Abstr. **43**, 2492 (1947). — [24] VANDENDRIESSCHE, L.: Enzymologia **10**, 69 (1941). — [25] MASSART, E. L., u. L. VANDENDRIESSCHE: Naturwiss. **1940**, 781. — [26] MORAES, A., u. A. CASIER: C. r. Soc. Biol. Paris **109**, 561 (1932). — [27] RONZONI, E., u. E. EHRENFEST: J. of biol. Chem. **115**, 749 (1936). — [28] HAAS, H. T. A.: Klin. Wschr. **23**, 382 (1944). — [29] LOOMIS, W. F., u. F. LIPMANN: J. of biol. Chem. **173**, 807 (1948). — [30] SPIEGELMAN, S.: J. cell. a. comp. Physiol. **30**, 315 (1947). — [31] REINER, J. M., u. S. SPIEGELMAN: J. cell. a. comp. Physiol. **30**, 347 (1947). — [32] CLIFTON, C. E.: Adv. in Enzymol. **6**, 269 (1946). — [33] GREVILLE, G. D.: Nature **1941** II, 320. — [34] MASSART, E. L., u. L. VANDENDRIESSCHE: Enzymologia **10**, 244 (1942). — [35] MASSART, L., u. R. DUFAIT: Enzymologia **9**, 320 (1941). — [36] LWOFF, A., u. H. JONESCU: C. r. hebd. sèanc. Acad. Sci. **225**, 263 (1947). — [37] HEYMANS, C.: Acta neerl. Physiol. **2**, 19 (1932). — [38] KRAHL, M. E., u. G. H. A. CLOWES: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **32**, 226 (1934). — [39] DE MEIO, u. E. S. G. BARRON: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **32**, 36 (1934). — [40] PEISS, C. N., u. J. FIELD: Stanford Med. Bull. **6**, 339 (1948). — [41] PEISS, C. N., u. J. FIELD: J. of biol. Chem. **175**, 49 (1948). — [42] FRANTZ jr. J. D., J. P. ZAMECNIK, J. W. REESE, u. M. L. STEPHENSON: J. of biol. Chem. **174**, 773 (1948). — [43] HOTCHKISS, R. D.: Adv. in Enzymol. **4**, 153 (1943). — [44] AMES, S. R., A. J. ZIEGENHAGEN, u. C. A. ELVEHJEM: J. of biol. Chem. **165**, 81 (1946). — [45] NICKERSON, W. J., u. L. G.

Mullins: Nature **161**, 939 (1948). — [46] Field, J., u. E. G. Tainter: Arch. internat. Pharmacodyn. **54**, 184 (1936). — [47] Magne, H., A. Mayer, u. L. Plantefol: Ann. de Physiol. **8**, 1 (1932). — [48] Handrovsky, H., H. Casier, u. Ch. Schepens: C. r. Soc. Biol. Paris **115**, 1727 (1934). — [49] Heymans, C.: J. of Pharmacol. **51**, 144 (1934). — [50] Warren, Ch. O.: Science **102**, 175 (1945). — [51] Cruz-Coke, E., J. Calvo, u. H. Niemeyer: Rev. Med. Chile **75**, 109 (1947). — [52] Cruz-Coke, E., H. Niemeyer, u. M. Maric: Bol. Soc. biol. Santiago Chile **4**, 14 (1947). — [53] Paschkis, K. E., A. Cantarow, u. E. K. Tillson: Endocrinology **40**, 114 (1947). — [54] Borell, U., u. H. Holmgren: Endocrinology **42**, 427 (1948). — [55] Glock, G. E.: Nature **158**, 169 (1946). — [56] Lerner, S. R., u. J. L. Chaikoff: Endocrinology **37**, 362 (1945). — [57] Dubois, K. P., R. G. Herrmann, u. W. F. Erway: J. of Pharmacol. **89**, 186 (1947). — [58] Tinacci, F.: Boll. Soc. ital. biol. sper. **23**, 1101 (1947). — [59] Bodine, J. H., u. L. R. Fitzgerald: Biol. Bull. **96**, 1 (1946). — [60] Tinacci, F.: Boll. Soc. ital. biol. sper. **23**, 1103 (1947). — [61] Jandorf, B. J., u. R. H. Williams: Am. J. Physiol. **141**, 91 (1944). — [62] Tipton, S. R., u. W. L. Nixon: Endocrinology **39**, 300 (1936). — [63] Tissières, A.: Arch. internat. Physiol. **54**, 305 (1946). — [64] Paschkis, K. E., A. Cantarow, A. E. Rakoff, u. E. K. Tillson: Science **102**, 333 (1945). — [65] Paschkis, K. E., A. Cantarow, u. E. K. Tillson: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **60**, 148 (1945). — [66] Dempsey, E. W.: Endocrinology **34**, 27 (1944). — [67] McShan, W. H., R. K. Meyer, u. D. R. Johansson: Endocrinology **38**, 152 (1946). — [68] Glover, E. C., G. A. Daland, u. H. L. Schmitz: Arch. internat. Med. **46**, 46 (1930). — [69] Warburg, O.: Der Stoffwechsel der Tumoren. Berlin 1926. — [70] Brock, N., H. Druckrey, u. H. Herken: Arch. exper. Path. **193**, 679 (1939). — [71] Abelin, I.: Arch. internat. Pharmacodyn. **75**, 187 (1947). — [72] Andik, I., L. Balogh, u. Sz. Donhofer: Exper. **5**, 249 (1949). — [73] Williams, R. H., G. A. Kay, u. B. J. Jandorf: J. clin. Invest. **23**, 613 (1944). — [74] Kühne, P.: Pharmazie **2**, 388, 443 (1947). — [75] Fellinger, K., u. J. Schmid: Wr. Z. inn. Med. **29**, 245 (1948). — [76] Hall, V. E., C. A. Brown, u. M. Sahyun: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **31** 380 (1933). — [77] Meyerhof, O., u. K. Lohmann: Biochem. Z. **171**, 381 (1926). — [78] Nickerson, W. J.: Exper. **5**, 202 (1949). — [79] Prina, C.: Boll. Soc. ital. biol. sper. **22**, 949 (1946). — [80] Tissières, A.: Arch. internat. Physiol. **55**, 252 (1947).

Doz. Dr. H. Siedek, I. Med. Univ.-Klinik, Wien IX, Lazarettgasse 14.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 289—293 (1950).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Péter-Pázmány-Universität Budapest
(Direktor: Prof. Dr. B. Issekutz).

Eine neue Methode zur Untersuchung der schmerzstillenden Wirkung*.

Von

Franz Herr und Johann Pérszász.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 5. Dezember 1949.)

Schon seit geraumer Zeit war man bemüht, Methoden auszuarbeiten, die auch in Tierversuchen die Wirkung der Analgetika zu messen und zu vergleichen erlauben.

Haffner[1] und Hesse[2] setzten eine Klammer auf den Schwanz bzw. den Anus der Mäuse und beobachteten dabei die durch den Schmerz ausgelösten Abwehrreaktionen, Pohle und Spieckermann[3] erzeugten Schmerz mit einer rot glühenden Nadel, Hesse und Roesler[4] spritzten Croton-Öl subkutan ein. Koll und Reffert[5] reizten die Zahnpulpa von Hunden elektrisch und maßen dabei die Intensität des schmerzerzeugenden Stromes. Eddy[6] preßte den Schwanz der Katze mit einem Apparat zusammen, der den schmerzhaften Druck in kg-Werten anzeigte. Hildebrandt[7] rief die Schmerzreaktion an Meerschweinchen mit einem heißen Metallzylinder hervor, Amor und Smith[8] setzten mittels einer Linse die Spitze von Rattenschwänzen der Wirkung von Wärmestrahlen aus, und bestimmten die Zeit, bis der Schwanz zu zucken anfing.

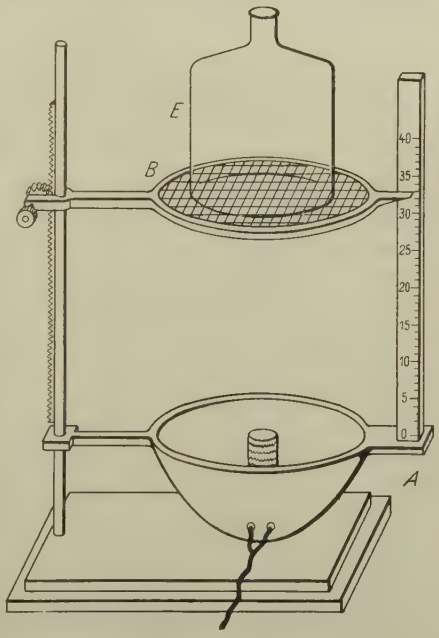


Abb. 1.

Obwohl die Meinung Starkensteins[9], daß Tierversuche zur Untersuchung der analgetischen Wirkung ungeeignet sind, nicht ganz grundlos erscheint — da ja der Schmerz eine subjektive Erscheinung ist und die durch den Schmerz hervorgerufenen Symptome, wie Abwehrbewegungen, Wimmern usw. nicht in einem bestimmten Verhältnis zu der Intensität des Schmerzes stehen —,

* Mit Unterstützung des Ungarischen Wissenschaftlichen Rates.

hat die Erfahrung doch bewiesen, daß Tierversuche sehr geeignet sind, um zu ermitteln, ob neu hergestellte Mittel überhaupt eine analgetische Wirkung besitzen, und wenn ja, in welchem Verhältnis diese zu der Wirkung des Morphins steht.

Folgender einfacher Apparat ermöglicht es uns, an Mäusen Schmerz erzeugende Wärmestrahlen genau zu dosieren und zu messen (Abb. 1): Wir befestigten etwa 20—40 cm über einem waagerecht liegenden elektrischen Radiator (*A*) ein Drahtnetz (*B*). Die Lage des Netzes kann durch ein Zahnrad geändert werden. Die Temperatur des Netzes wird mit einer unmittelbar darunter angebrachten Thermoelektrode (*C*) gemessen. Das Drahtnetz erreicht in 20 min die erwünschte Temperatur. Damit der Luftzug die Temperatur des Drahtnetzes nicht beeinflusse, befestigen wir auf dem Rahmen des Netzes einen Kartonzylinder, der auch den Radiator umfängt, und mit dem Drahtnetz zu bewegen ist. Zur groben Einstellung der Temperatur des Drahtnetzes schalteten wir einen Rheostaten in den Stromkreis für den Radiator; die feine Einstellung der Temperatur wurde durch Heben und Senken des Netzes erzielt. Die Maus wurde unter einem Glassturz (*E*) auf das Netz gesetzt. Die Methode ist nur dann exakt, wenn die Temperatur des Drahtnetzes während des Versuches gleich bleibt.

Im Versuch erhitzt man das Netz auf die gewünschte Temperatur: 53—70° C. Dann bringt man das Tier unter den Glassturz. Zunächst verhält sich die Maus ganz ruhig; später versucht sie zu flüchten, und wenn sie schließlich die Hitze nicht mehr aushalten kann, springt sie in die Höhe. Wir bezeichnen die Zeitspanne zwischen dem Aufsetzen des Tieres auf das Netz und seinem Sprung als Schmerzreaktionszeit (SchRZ).

Zuerst untersuchten wir, wieweit die SchRZ von der Temperatur des Drahtnetzes beeinflußt wird. Wir vollführten die Versuche bei 53, 57, 60, 63 und 65° C an je 20, bei 70° C an 130 Tieren (Tab. 1). Bei niedriger Temperatur (53—57° C) erwies sich die Empfindlichkeit der Tiere gegenüber dem von der Hitze verursachten Schmerz sehr verschieden. Bei 53° C äußerten von 20 Tieren 7, und bei 57° C von 20 Tieren 4 keine Schmerzempfindung. Bei jedem Wärmegrad nahmen wir nach einer bestimmten Zeit Mäuse wieder aus dem Glassturz heraus, auch wenn sie keinen Schmerz zeigten. Wir ließen sie also bei 53° C höchstens 10 min, bei 57° C höchstens 8 min und bei 70° C 4 min unter dem Glassturz. Nach dieser Zeit kollabieren die Tiere entweder sofort, oder sie gehen später an Brandwunden zugrunde. 65 und 70° C fanden wir für Messungen geeignet, weil die Tiere sogar 2 min über die SchRZ hinaus ohne Schaden unter dem Glassturz zu halten sind, selbst wenn sie infolge der Wirkung eines Mittels keinen Schmerz empfanden. Ließen wir nach der ersten SchRZ den Tieren 30 min Ruhe, und wiederholten dann die Bestimmung der SchRZ, so war diesmal die SchRZ kürzer. Bei 70° C betrug beim ersten Versuch die SchRZ von 79 Mäusen 1 min, von 42 2 min und von 9 3 min. Nach einer Pause von 30 min betrug die SchRZ bei 107 Tieren 1 min und bei 23 2 min. Die zweite SchRZ ist also kürzer als die erste; die dritte SchRZ ist noch etwas kürzer.

Nachdem sich 70° C als am besten geeignet für die Messungen ergeben hatten, untersuchten wir die Wirkung einiger Analgetika bei diesem Wärmegrad. Wir bestimmten zuerst in einem Abstand von 30 min

die SchRZ zweimal, injizierten danach das Mittel unter die Rückenhaut der Maus und maßen weitere 30 min nach der Injektion die Verlängerung der SchRZ. Da aber die zweite und dritte SchRZ kürzer ist als die erste, kann eine Verlängerung der dritten SchRZ nur die Folge einer Schmerzlinderung sein.

Tabelle 1.

C°	Gesamtzahl der Tiere	Minutenzahl										
		0—1	1—2	2—3	3—4	4—5	5—6	6—7	7—8	8—9	9—10	10—11
53	20	—	—	—	2	—	3	5	2	1	—	(7)
57	20	—	—	2	3	4	5	2	—	(4)		
60	20	—	1	4	7	2	2	4				
63	20	—	5	11	3	—	—	1				
65	20	1	10	4	5	—	—					
70	130	79	42	9	—							
		107	23	—	—							

Die Zahlen in den Minutenrubriken bedeuten die Zahl der Mäuse, die zu dieser Zeit Schmerzreaktion äußerten. ( ) = *keine* Schmerzreaktion.

Um die Brauchbarkeit dieser Methode zu prüfen, verglichen wir die analgetische Wirkung des Morphins, Polamidons, Dolantins und Hexalgons* (Chinoin, *Budapest*), an je 50—60 Mäusen.

Tabelle 2. *Prüfung der SchRZ an 10 Mäusen nach 3 mg Morphin je kg.*

Nr.	Körpergewicht in g	Minuten			Zunahme in %	Stärke der analg. Wirkung
		I. SchRZ	II. SchRZ	SchRZ nach 3 mg/kg Mo.		
1	20	38	24	40	67	+
2	18	32	31	89	187	+ +
3	22	37	35	60	71	+
4	19	34	31	37	19	—
5	21	82	57	86	51	—
6	17	77	79	92	16	—
7	18	70	50	62	24	—
8	20	65	23	70	204	+ + +
9	22	72	53	117	120	+ +
10	18	36	42	80	95	+

Das Gewicht der im Versuch verwendeten Mäuse war 15—26 g, wir konnten jedoch feststellen, daß die SchRZ vom Gewicht der Mäuse gänzlich unabhängig war. Wir bezeichneten eine Verlängerung der SchRZ um 50—100% mit einem Kreuz, um 100—200% mit zwei, um 200—300% mit drei Kreuzen. Betrug sie mehr als 300% oder äußerte das Tier überhaupt keine Schmerzempfindung, so setzten wir vier Kreuze. Eine Verlängerung unter 50% wurde nicht als analgetische Wirkung gerechnet, da die Streuung der SchRZ 20—30% ausmachen kann.

* Zur Chemie der Stoffe vgl. folgende Arbeit (S. 295/96).

Die Ergebnisse über die Wirkung von 3 mg/kg Morphin finden sich auf Tabelle 2. Diese Dosis wirkte also bei 6 von je 10 Tieren analgetisch. Die Wirkung erwies sich bei 3 Tieren als +, bei 2 Tieren als ++ und bei 1 Tier als +++. Die Ergebnisse analoger Versuche mit höheren Dosen von Morphin sowie mit den übrigen Analgeticis sind in abgekürzter Form auf Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3. *Prüfung der SchRZ nach dem gleichen Verfahren wie in Tab. 2.* Doch sind nur die Ergebnisse der dortigen letzten Säule (7) systematisch geordnet wiedergegeben. (Die oberste Reihe entspricht der Versuchsreihe der Tab. 2.)

Analgeticum	Dosis mg/kg	Zahl der Tiere	Keine Analgesie bei Tieren	+ analgetisch	++ analgetisch	+++ analgetisch	++++ analgetisch	Analget. Wirkung in % der Tiere	Analgetischer Quotient	Prescott's analget. Quotient
Morphin	3	10	4	3	2	1	—	60		
	5	20	3	4	6	3	4	85		
	7	20	—	2	4	4	10	100	1,0	1,0
Polamidon	3	20	4	8	7	1	—	80		
	5	20	—	4	7	4	5	100		
	7	10	—	—	4	2	4	100	1,4	1,3
Hexalgon	5	20	10	5	4	1	—	50		
	7	20	4	5	4	3	4	80		
	10	20	—	2	7	5	6	100	0,7	
Dolantin	10	10	6	3	1	—	—	40		
	20	10	3	4	—	2	1	70		
	35	20	2	2	10	—	6	90		
	40	20	—	—	5	7	8	100	0,17	0,15

Wenn wir die Wirkung des Morphins als Einheit betrachten, beträgt die Wirkung des Polamidons 1,4, die des Hexalgons 0,7, die des Dolantins 0,15. Die letzte Rubrik der Tabelle enthält die von PRESCOTT, RANSOM, THORP und WILSON[10] festgestellten Quotienten, welche die analgetische Wirkung an weißen Ratten mit der Methodik von THORP[11] bestimmten. TROXIL[12] untersuchte die Intensität der Analgetika an 400 Krebskranken und stellte fest, daß die Wirkung von 10 mg Polamidon der Wirkung von 15 mg Morphin und 150 mg Dolantin gleichkommt. Es geht hieraus deutlich hervor, daß die Ergebnisse unserer Methodik gänzlich mit ihren Ergebnissen und klinischen Erfahrungen übereinstimmen.

Es gelang uns also offensichtlich, den Reiz strahlender Wärme an Mäusen genau zu dosieren und doch die Intensität der analgetischen Wirkung auf jedes einzelne Tier ohne dessen Schädigung abzulesen. Die SchRZ kann auch über 300% steigen, ohne die Tiere zu schädigen. Unter den in unseren Versuchen verwendeten 450 Mäusen gab es nur

10, welche die Schmerzempfindung nicht durch Aufspringen offenbarten. Die Mäuse gewöhnen sich nicht an diese Methode, sie verlernen also nicht, den Schmerz durch einen Sprung anzuzeigen. Auch bei täglich wiederholten Versuchen wurde die SchRZ nicht kürzer.

Zusammenfassung.

1. Mit einfachen Laboratoriumsmitteln wurde eine Methode ausgearbeitet, um den Schmerzreiz mit Wärmestrahlen genau zu dosieren und die analgetische Wirkung an weißen Mäusen zu messen

2 Um unsere Methodik auszuprobieren, verglichen wir die analgetische Wirkung des Morphins, Polamidons, Hexalgons und Dolantins.

3 Die auf diese Weise erhaltenen Ergebnisse stimmen mit den bisherigen Daten der Literatur genau überein.

Literatur.

[1] Haffner, F.: Dtsch. med. Wschr. **65**, 731 (1929). — [2] Hesse, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **158**, 233 (1930). — [3] Pohle, K., u. Spieckermann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **162**, 865 (1931). — [4] Hesse, E., G. Roesler, u. F. Büchler: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **158**, 247 (1930). — [5] Koll, W., u. H. Reffert: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **190**, 687 (1938). — [6] Eddy, N. B.: J. of Pharm. a. Exper. Therap. **45**, 339 (1932). — [7] Hildebrandt, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **174**, 405 (1934). — [8] D'Amour, F. E., a. D. L. Smith: J. of Pharmacol. a. Exper. Therap. **72**, 74 (1941). — [9] Starkenstein, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **165**, 325 (1932). — [10] Prescott, F., S. G. Ransom, R. H. Thorp, a. A. Wilson: Lancet **256**, 340 (1949). — [11] Thorp, R. H.: Brit. J. of Pharm. **1**, 113 (1946). — [12] Troxil, E. B.: J. Amer. Med. Ass. **136**, 920 (1948).

Prof. Dr. B. Issekutz, Budapest VIII, Üllöi-Ut 26.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 294—304 (1950).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Péter-Pázmány-Universität Budapest
(Direktor: Prof. Dr. B. Issekutz).

Über die Wirkung einiger Derivate des Polamidons*.

(2-Dimethylamino-4, 4-diphenylheptan-5-ons.)

Von

Franz Herr und Johann Pérszász.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 5. Dezember 1949.)

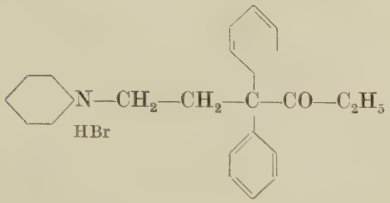
Die Entdeckung des Dolantins ist als ein großer Fortschritt zu bezeichnen[1], [2]. Seine schmerzstillende Wirkung ist zwar 8mal schwächer, als die des Morphins, aber es hebt, analog dem Atropin und Papaverin, auch den Krampf der glatten Muskulatur auf.

Die mit dem Dolantin erreichten guten Resultate regten weitere großangelegte Forschungen an. Bockmühl und Erhart[3] stellten eine ganze Reihe Dolantinähnlicher Verbindungen her. Sie untersuchten die analgetische und spasmolytische Wirkung jeder einzelnen dieser Verbindungen und fanden am wirksamsten die Verbindung: Hoechst Nr. 10820 (2-Dimethylamino-4, 4-diphenylheptan-5-on). Bei ihrer ausführlichen pharmakologischen Erforschung durch Scott und Chen[4, 5] wurde festgestellt, daß sie in ihren Eigenschaften dem Morphin ähnlich ist, aber stärker analgetisch; auch sie löst — wie Dolantin — den Krampf der glatten Muskulatur. Infolge dieser Eigenschaften wurde es unter mehreren Namen in Verkehr gebracht (Polamidon, Methadon, Adanon, Amidon, Dolophin, Miadon, Physepton). Nach den klinischen Untersuchungen von Troxil[6] ist die analgetische Wirkung von 10 mg Polamidon gleich der von 15 mg Morphin oder 150 mg Dolantin. Die therapeutische Verwendbarkeit des Polamidons regte die Forscher an, neue Derivate desselben herzustellen. Über einige Polamidonderivate berichteten Thorp, Waltner und Offner[7]. Chen[8] untersuchte 33 Polamidonderivate pharmakologisch und stellte fest, daß die analgetische Wirkung des 3-Azetoxy-6-dimethylamino-4, 4-diphenylheptans stärker ist, als die vom Polamidon.

Wir selbst führten die pharmakologische Untersuchung von Verbindungen aus, die von R. König und K. Magyar hergestellt waren. Unter diesen ist das Hexalgon (1-Piperidino-3,3-diphenylhexan-4-on) identisch mit der von Bockmühl und Erhart hergestellten Verbindung: N° 10495 und der Verbindung N° 68/C/47 von Thorp, Waltner und Offner. Die übrigen Verbindungen sind unter den Nummern 300—311 hierunter aufgeführt.

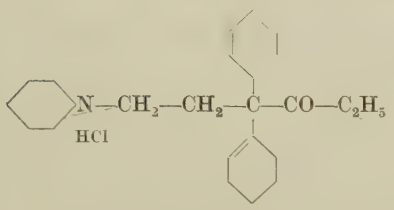
* Mit Unterstützung des Ungarischen Wissenschaftlichen Rates.

Hexalgon (1-Piperidino-3, 3-diphenyl-hexan-4-on. HBr)



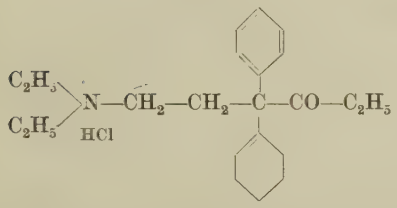
(Schmelzpunkt: 193—194° C)

A 300 (1-Piperidino-3-phenyl-3-cyclohexenyl-hexan-4-on. HCl)



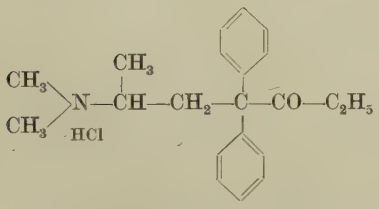
(Schmelzpunkt: 173° C)

A 301 (1-Diäthylamino-3-phenyl-3-cyclohexenyl-hexan-4-on. HCl)



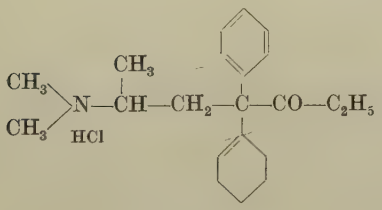
(Schmelzpunkt: 84° C)

A 302 Polamidon (2-Dimethylamino-4, 4-diphenyl-heptan-5-on)

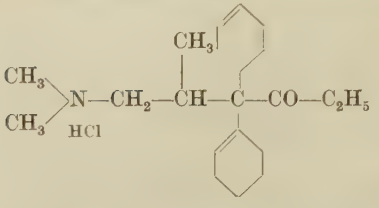


(Schmelzpunkt: 231° C)

A 303 (2-Dimethylamino-4-phenyl-4-cyclohexenyl-heptan-5-on. HCl)



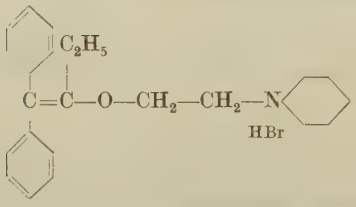
A 304 (1-Dimethylamino-2-methyl-3-phenyl-3-cyclohexenyl-hexan-4-on. HCl)



A 305 Dehydroderivat von A 303.

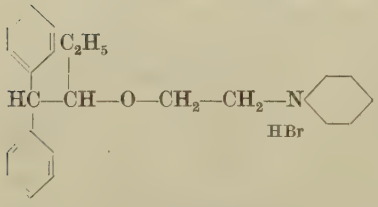
A 306 Dehydroderivat von A 304.

A 307 (1,1-Diphenyl-2-äthyl-äthylen-2 [piperidino-äthylol] äther. HBr)



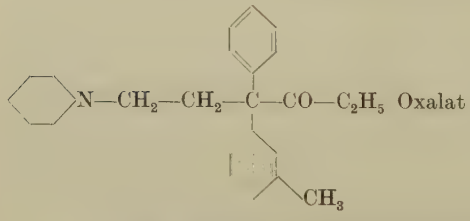
(Schmelzpunkt: 183—184° C)

A 308 (1,1-Diphenyl-2-äthyl-äthyl-2 [piperidino äthylol] äther. HBr)



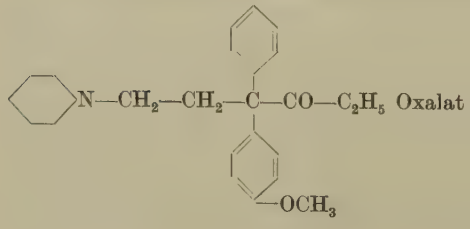
(Schmelzpunkt: 159° C)

A 309 (1-Piperidino-3-phenyl-3-m-tolyl-hexan-4-on. Oxalat)



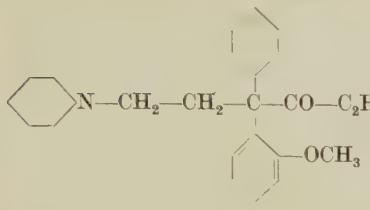
(Schmelzpunkt: 190° C)

A 310 (1-Piperidino-3-phenyl-3-p-anisyl-hexan-4-on. Oxalat)



(Schmelzpunkt: 169° C)

A 311 (1-Piperidino-3-phenyl-3-o-anisyl-hexan-4-on. Oxalat)



(Schmelzpunkt: 217° C)

I. Analgetische Wirkung.

Wir prüften die analgetische Wirkung an weißen Mäusen mit der in der vorangehenden Mitteilung beschriebenen Methodik. Alle Verbindungen wurden s.c. verabreicht. Die Resultate sind aus der Tabelle 1 ersichtlich. Am stärksten analgetisch wirkt das Polamidon, von dem 5 mg/kg dieselbe analgetische Wirkung ausübt, wie 7 mg/kg Morphin, 10 mg/kg Hexalgon und 35 mg/kg Dolantin. Die Verbindung N° 311 ist 5—6mal schwächer als das Morphin. Die übrigen Verbindungen haben entweder keine analgetische Wirkung, oder wirken 9mal schwächer als das Morphin.

Hieraus ist zu ersehen, daß bei Polamidon die partielle Hydrierung einer der beiden Phenylgruppen zur Verminderung der analgetischen Wirkung führt (A 303, A 304, A 305, A 306). Die Verzweigung der Aminoalkylkette, wie z. B. in A 303, erhöht nicht die analgetische Wirkung, obwohl im allgemeinen durch die Verzweigung einer geraden Kette die Wirkung gesteigert wird. Wenn wir anstatt der Methylaminogruppe eine gesättigte zyklische Gruppe ins Molekül einführen, dann entstehen wirksame Verbindungen. Das stimmt mit der allgemeinen Erfahrung überein, daß die an N gebundenen hydrierten Ringe wirksame Verbindungen erzeugen. Einführung anderer chemischer Gruppen in die Phenylringe ergab keine wirksamen Verbindungen.

Die charakteristische Schwanzreaktion der Mäuse wird vom Polamidon und Morphin (0,5—1 mg/kg), vom Hexalgon (1—2 mg/kg) und vom Dolantin (5 mg/kg) durch $^1/_5$—$^1/_{10}$ der analgetischen Dosen ausgelöst. Bei den übrigen Verbindungen stellt sich die Schwanzreaktion erst nach den analgetischen Dosen ein.

II. Toxizität.

Die Toxizität des Polamidons, Hexalgons und Morphins wurde an weißen Mäusen bestimmt, indem jede einzelne Gabe an je 6 Mäuse s.c. verabreicht wurde. Die toxischen Symptome begannen bei allen drei Mitteln mit einem hochgradigen Erregungszustand, der in eine sich sukzessiv steigernde Muskelschwäche überging, zum Schluß verendeten die Versuchstiere in tiefer Betäubung unter Krämpfen. Die

Schwanzreaktion blieb bis zum Ende positiv. Bei Anwendung von Hexalgon und Polamidon gingen wir von der Anfangsdose zu 60 mg/kg um je 20 mg, bei Morphin von 250 mg/kg um je 40 mg aufwärts bis zur DL_{100}. Aus diesen Daten wurde mittels der Behrensschen Formel die DL_{50} ausgerechnet. Die des Hexalgons beträgt 110 mg/kg, die des Polamidons 90 mg/kg und die des Morphins 370 mg/kg. Bei den übrigen Verbindungen bestimmten wir nur die DL_{100} (Tabelle 1).

Tabelle 1. *Analgetische und letale Dosen an Mäusen.*

Name der Verbindung	Analgetische Dosis mg/kg	Schwanzreaktion mg/kg	Dos. let. 100 mg/kg
Morphin . .	7	0,5—1	450
Polamidon .	5	0,5—1	120
Dolantin . .	35	5— 7	200
Hexalgon . .	10	1— 2	140
A 311. . . .	40	20	160
A 303. . . .	40—50	in analg. dos.	40—50
A 300. . . .	60	„	140
A 301. . . .	60	„	120
A 306. . . .	60	„	90
A 307. . . .	60	„	120
A 309. . . .	60	„	100
A 304. . . .	>60	—	80
A 308. . . .	>60	—	90
A 305. . . .	>70	—	130
A 310. . . .	>70	—	110

Die Toxizität des Polamidons und Hexalgons ist ungefähr die gleiche, wie die des Codeins. Das letztere erweist sich an Versuchstieren viel toxischer als das Morphin, da seine Krampfwirkung stärker ist. An Menschen wird hingegen die Toxizität der Morphinderivate durch die Stärke ihrer atemlähmenden Wirkung bestimmt. Da nun Codein auf das Atemzentrum des Menschen viel schwächer wirkt als das Morphin, ist auch seine Gefährlichkeit viel geringer. Nicht selten wird ja Codein auch Säuglingen und kleinen Kindern von solchen Ärzten verordnet, die das Morphin in diesen Fällen für bedenklich halten.

III. Wirkung auf die Atmung.

Unseres Erachtens kann man aus dem Umstand, daß das Polamidon und Hexalgon bei Mäusen toxischer wirkt, nicht auf ihre Wirkung am Menschen folgern, da bei diesen ähnlich dem Kodein die Krampfwirkung der Verbindungen stärker ist. Wir können sie vielmehr aus den Versuchen ersehen, in denen wir die Wirkung der Verbindungen auf das Atemzentrum mit der des Morphins verglichen.

Die Reizbarkeit des Atemzentrums wurde mit der Inhalation von 6% CO_2 enthaltender Luft gemessen[9]. Zur Messung des Atemvolumens des Kaninchens wurde der von Impens[10] angegebene, etwas modifizierte Apparat verwendet (Abb. S. 299).

Die Atmungskappe ist mit den Wasserventilen V_1 und V_2 verbunden. Das Ein- und Ausatmen erfolgt vor der Messung durch diese Ventile. Bei der Messung wird

der Hahn C in die auf der Abbildung sichtbare Stellung gebracht. Demzufolge gelangt die ausgeatmete Luft durch das Rohr B in die 10 l fassende DEVILLE-Flasche, aus der die gleiche Menge Wasser herausfließt. Dieses wird in einem Meßzylinder aufgefangen. Das U-förmig gebogene Ausflußrohr D von 15 mm Durchmesser ist um seine Längsachse drehbar. Durch entsprechende Einstellung wird die Aspirationswirkung des Wassers gerade so groß, daß die Luftsäule bis zum Boden des Rohres B reicht, aber das Wasser ohne Einblasung nicht heraustropft. Demzufolge hat der Apparat beinahe gar keinen Widerstand und erschwert nicht die Atmung. Das ist deshalb wichtig, weil das Atemvolumen schon durch einen geringen Widerstand herabgesetzt wird. Vor Beginn der Messung warteten wir mindestens 15 min, damit sich das Tier an das Atmen durch die Ventile gewöhne und die Atmung gleichmäßig werde. Wir haben in der Regel die Dauer von je 10 Atemzügen mit einer Stoppuhr gemessen und das Volumen des herausgeflossenen Wassers im Meßzylinder abgelesen. Das herausgeflossene Wasser konnten wir von Zeit zu Zeit nach Öffnung des Hahns a_2 durch das Rohr D ersetzen.

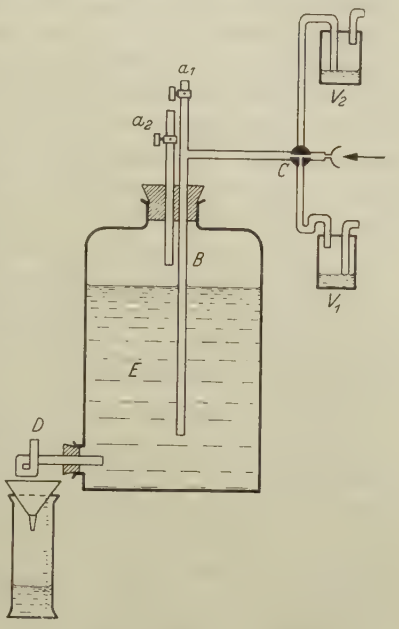


Abb. 1.

Atemfrequenz und -volumen wurden 5—10mal in 1—2 Minutenintervallen ge-

Tabelle 2. *Wirkung auf die Atmung ohne und mit CO_2-Zufuhr an Kaninchen.*

Analgeticum	Dosis mg/kg	Atemfrequenz pro min vor Analgetic.	Atemfrequenz pro min nach Analgetic.	Atemvolumen pro min vor Analgeticum	Atemvolumen pro min nach Analgeticum	Änderung in %	Änderung des Atemvolumens durch CO_2 cm³ vor Analgeticum	Änderung des Atemvolumens durch CO_2 cm³ nach Analgeticum	Änderung % vor Analgeticum	Änderung % nach Analgeticum
Morphin	1,0	67	69	1050	1070	+ 2	1400	1420	33	+32
	2,5	48	48	943	640	—32,1	1250	805	33	+26
	5,0	56	28	870	470	—46	1100	530	26	+13
	7,5	58	21	1180	530	—50	1460	570	24	— 3,4
	10,0	59	18	810	220	—73	1090	198	34	—10,5
Polamidon	1,0	67	60	812	780	— 3,9	1130	890	39	+14
	2,5	60	20	1100	790	—28,2	1520	865	38	+10,5
	5,0	55	30	720	490	—31,7	1000	430	39	—12,2
	7,5	60	19	785	255	—67,5	970	215	23,3	—15,2
	10,0	52		750			940		25,3	
Hexalgon	1,0	66	64	910	900	— 1,1	1200	1180	32	+31
	2,5	56	50	1050	810	—22,8	1375	990	31	+22
	5,0	57	26	820	600	—26,8	1080	715	31,7	+19
	7,5	60	22	1080	620	—42,6	1480	690	37	+11
	10,0*	65	10	900	190	—79,0	1140	200	26,7	+ 5,3

* Tonischer Krampf, CHEYNE-STOKES-Atmung; nach dem Krampf gemessen.

messen. Sobald sie nur mehr unbedeutende Schwankungen zeigten, ließen wir 6% CO_2haltige Luft aus einem dem Ventil V_2 angeschlossenen Gummibeutel einatmen. 5 min nach Beginn der CO_2-Einatmung bestimmten wir die Zahl und das Volumen der Atmung. Die Frequenz zeigte beinahe keine Änderung, aber das Minutenvolumen erhöhte sich um 24—39%. Auch diese Messung wurde 3—5mal wiederholt, dann das zu untersuchende Analgetikum s. c. injiziert und nach 30 min die Atmungsfrequenz und das Minutenvolumen vor und nach dem Einatmen vom 6% CO_2 wieder gemessen.

Die Messungen wurden an 18 Kaninchen ausgeführt, die Ergebnisse in der Tabelle 2 zusammengefaßt. Bei allen drei Mitteln untersuchten wir die Wirkung von 1; 2,5; 5; 7,5 und 10 mg/kg auf die Atmung. Jede Dosis, ausgenommen die von 10 mg/kg Polamidon und Hexalgon, wurde mindestens an 3 Kaninchen ausprobiert und der Durchschnittswert in die Tabelle aufgenommen. Die Atemfrequenz und das Minutenvolumen wurden durch alle drei Verbindungen in der Dosis von 2,5 bis 7,5 mg wesentlich und beiläufig im selben Ausmaß vermindert, höchstens am Hexalgon konnten wir eine etwas schwächere Wirkung beobachten.

Wesentlich größer sind die Unterschiede bezüglich der Wirkung auf die Erregbarkeit des Atemzentrums durch CO_2. Polamidon vermindert diese schon in einer Dosis von 1 mg/kg, so daß das Minutenvolumen nach CO_2-Einatmung anstatt der normalen 39% nur um 14% zunimmt. Eine so starke Wirkung hat Morphin erst in einer Menge von 5 mg/kg. Polamidon ändert in dieser Menge den CO_2-Effekt schon völlig, insofern das Atemvolumen überhaupt nicht zu-, sondern um 12% abnimmt. Die gleiche Änderung wird durch 10 mg/kg Morphin hervorgerufen. Am wenigstens wird die CO_2-Erregbarkeit des Atemzentrums durch Hexalgon vermindert: Nach 7,5 mg/kg tritt noch eine 11%ige Zunahme des Atemvolumens auf. 10 mg/kg Polamidon und Hexalgon lösen schon tonische Krampfanfälle aus, deshalb kann die Wirkung dieser Mengen auf die Atmung gar nicht untersucht werden. Der durch Hexalgon ausgelöste Krampf hörte 50 min nach der Injektion auf, dann erst führten wir unsere Messung aus. Wegen seiner schwächeren Wirkung auf das Atemzentrum erscheint es möglich, daß Hexalgon auf den Menschen weniger toxisch wirkt, als Morphin und Polamidon. Intravenös lähmen alle drei Verbindungen ziemlich leicht das Atemzentrum, was wir bei der Untersuchung ihrer Wirkung auf den Blutdruck beobachtet hatten. Das mahnt zu einer gewissen Vorsicht bei der i.v. Anwendung dieser Analgetika.

IV. Wirkung auf das Brechzentrum.

Harnack[11], Guinard[12], Issekutz[13] hatten den Beweis erbracht, daß das Brechzentrum durch Morphin nach anfänglicher Reizung gelähmt wird. Wir untersuchten die Frage, ob auch das Hexalgon und Polamidon diese Wirkung haben. Die Versuche wurden an 2 Hunden

ausgeführt, denen wir 0,5—1 mg Apomorphin i.m. einspritzten und dann beobachteten, wann und wie oft das Erbrechen erfolgte. Nach 1—2 Tagen gaben wir den Hunden Hexalgon, Polamidon oder Morphin. Hexalgon und Polamidon allein riefen in Gegensatz zum Morphin kein Erbrechen hervor. 30 min nach dem Analgetikum gaben wir Apomorphin, und wenn dies schon kein Erbrechen erzeugte, wiederholten wir die Versuche am nächsten Tag mit kleineren Gaben, um die kleinste Menge ausfindig zu machen, die das Apomorphinerbrechen verhindert (Tabelle 3). Diese Menge war bei Morphin und bei Polamidon 0,5 mg/kg und bei Hexalgon 1,5 mg/kg.

Tabelle 3. *Wirkung auf das Brechzentrum von Hunden.*

Morphin				Polamidon				Hexalgon			
Hund	Dos. mg/kg	Apomorphin Dosis mg pro Tier	Erbrechen	Hund	Dos. mg/kg	Apomorphin Dosis mg pro Tier	Erbrechen	Hund	Dos. mg/kg	Apomorphin Dosis mg pro Tier	Erbrechen
A	1,0	0,5	—	A	2,0	1,0	—	A	3,0	0,5	—
A	0,5	0,5	—	A	3,0	0,5	—	A	2,0	0,5	
A	0,25	0,5		A	2,0	0,5	—	A	2,5	0,5	
A	0,1	0,5		A	1,0	0,5	—	B	5,0	1,0	—
B	1,0	1,0	—	A	0,5	0,5		B	2,0	0,5	—
B	0,5	0,5	—	A	0,5	0,5	—	B	1,5	0,5	—
B	0,2	0,5		B	2,0	1,0	—	B	1,0	0,5	
				B	1,0	0,5	—				
				B	0,5	0,5	—				
				B	0,25	0,5					

V. Wirkung auf den Blutdruck.

Wir untersuchten diese Wirkung vom Morphin, Polamidon und Hexalgon an Katzen in Urethannarkose (1 g/kg s.c.) mittels eines in die Karotis eingebundenen Hg-Manometers. Die zu untersuchenden Substanzen wurden in einer 0,9%igen NaCl-Lösung gelöst in die V. femoralis injiziert. 0,5 mg/kg Morphin senkte den Blutdruck für 1 min um 12; 2 mg/kg um 34 mm Hg, wonach er langsam steigend in 6 min seine frühere Höhe erreichte. Die gleiche Menge hob die Atmung auf, die aber nach 15 min dauernder künstlicher Atmung wieder in Gang kam. 5 mg/kg Morphin setzten den Blutdruck um 50 mm Hg herab, wonach er seine ursprüngliche Höhe nicht mehr erreichte. Die Atmung hörte auf, kam aber nach 30 min dauernder künstlicher Atmung zurück. 0,5 mg/kg Polamidon senkten den Blutdruck für 1 min um 6—8; 2,5 mg/kg vorübergehend um 22 mm Hg, während die Atmung aufhörte; nach einer 18 min währenden künstlichen Atmung stellte sie sich wieder spontan ein, blieb aber periodisch. Der Blutdruck schwankte um 30—36 mm Hg. 5 mg/kg Polamidon setzten den Druck um 35 mm Hg

herab; die Schwankungen des Blutdruckes waren nur halb so groß. 0,5 mg/kg Hexalgon verminderten den Blutdruck vorübergehend um 6; 2 mg/kg für 1 min um 20—25; 5 mg/kg um 50—60 mm Hg bei gleichzeitiger Atemlähmung, die nach künstlicher Atmung von 45 min Dauer behoben war.

VI. Spasmolytische Wirkung.

Die Versuche wurden an überlebenden Kaninchendarmschlingen ausgeführt, die in 15 cm³ 38° C warmer Tyrodelösung aufgehängt waren. Den Darmkrampf erzeugten wir mit 0,33 mg Pilokarpin oder 50 mg Bariumchlorid. Der Pilokarpinkrampf wird durch 12,5 γ Polamidon und Hexalgon gleich stark und 2,4mal stärker als durch 30 γ Papaverin gelöst.

Die Wirkung der Verbindungen A 300, A 301 und A 311 ist nur halb so groß wie die des Polamidons, aber noch immer stärker als die des Papaverins. Die Verbindungen A 308 und A 309 besitzen nur 0,8, A 310 0,6, A 307 0,15 der Papaverinwirkung. $BaCl_2$-Krampf wird durch Polamidon 1,5mal stärker gelöst als durch Papaverin, während das Hexalgon etwas schwächer wirkt als dieses. Gleich wirksam mit Hexalgon sind die Verbindungen A 301, A 300 und A 310, schwächer die Verbindungen A 309, A 308 und A 307.

Aus Untersuchungen von Fromherz[14] und Issekutz[15] ist bekannt, daß Papaverin den Pilokarpin- und $BaCl_2$-Krampf durch eine myogene Wirkung gleich stark löst. Die 20%ige Abweichung in unseren Versuchen ist dem Umstande zuzuschreiben, daß wir die spasmogene Dosis von Pilokarpin und $BaCl_2$ nicht proportional gewählt hatten. Pilokarpin erzeugte einen schwächeren Krampf als $BaCl_2$, daher war zur Lösung des Pilokarpinkrampfes 20% weniger Papaverin nötig.

Bei den anderen Mitteln ist der Unterschied bedeutend größer: So löst Polamidon den Pilokarpinkrampf 2mal, Hexalgon 4mal, A 311 3mal, A 301 und A 300 2mal so stark, so daß sich bei ihnen, wie beim Dolantin eine atropinartige Wirkungsweise erkennen läßt (Tabelle 4).

Tabelle 4. *Spasmolytische Wirkung am isolierten Kaninchendarm.*

Name der Verbindung	Pilokarpin-krampf 0,33 mg/15 cm³ lösen γ/15 cm³	$BaCl_2$ Krampf 50 mg/15 cm³ lösen γ/15 cm³
Polamidon .	12,5	25,0
Hexalgon . .	12,5	50,0
A 311. . . .	25,0	75,0
A 301. . . .	25,0	50,0
A 300. . . .	25,0	50,0
Papaverin .	30,0	37,5
A 308. . . .	37,5	100,0
A 309. . . .	37,5	62,5
A 310. . . .	50,0	50,0
A 307. . . .	200,0	200,0

Die Untersuchungen von Issekutz sen. und jun.[15] hatten gezeigt, daß eine Verbindung den Krampf der glatten Muskulatur um so besser löst, je größer ihre Oberflächenaktivität ist. Wir bestimmten die Oberflächenspannung nach der Methode von Du Noüy[16].

Da bei Alkaloiden nur die Basen kapillaraktiv sind, führten wir unsere Messungen in einer Tyrodelösung bei p_H 7,5 aus; zunächst wurde die Oberflächenspannung von 9 cm³ Tyrodelösung bestimmt, danach 1 cm³ 10^{-2} bis 10^{-3} molarer Lösung der zu untersuchenden Verbindung hinzugegeben und die dadurch verursachte Verminderung der Oberflächenspannung bestimmt.

So war die definitive Konzentration 10^{-3} bis 10^{-4} molar. Wir konnten einen ausgesprochenen Zusammenhang zwischen der Lösung des $BaCl_2$-Krampfes und der Verminderung der Oberflächenspannung nachweisen (Tabelle 5). Polamidon, dessen Kapillaraktivität die größte ist, löst auch den $BaCl_2$-Krampf am stärksten. Etwas schwächer war die spasmolytische Wirkung des Papaverins, das 10^{-3} molar die Oberflächenspannung auf 59,6 dyn herabsetzte. Hexalgon, A 300, A 301 und A 310 lösten den $BaCl_2$-Krampf gleich stark. Ihre Oberflächenaktivität war innerhalb der Fehlergrenzen der Messung auch annähernd gleich. Am schwächsten spasmolytisch wirkte die Verbindung A 307 und ebenso war ihre Wirkung auf die Oberflächenspannung gering.

Tabelle 5. *Erniedrigung der Oberflächenspannung wäßriger Lösung im Vergleich zur spasmolytischen Wirkung.*

Name der Verbindung	$BaCl_2$-Krampf lösen γ/15 cm³	Oberflächenspannung dyn/cm in 10^{-3} mol. Conc.	Oberflächenspannung dyn/cm in 10^{-4} mol. Conc.	Spasmolytische mol. Conc.
Polamidon .	25	57,25	64,28	$5{,}39 \cdot 10^{-6}$
Papaverin . .	37,5	59,6	65,35	$7{,}37 \cdot 10^{-6}$
Hexalgon . .	50,0	61,37	68,42	$9{,}94 \cdot 10^{-6}$
A 300. . . .	50,0	61,8	68,67	$9{,}82 \cdot 10^{-6}$
A 301. . . .	50,0	60,87	67,11	$9{,}76 \cdot 10^{-6}$
A 310. . . .	50,0	61,52	69,29	$8{,}56 \cdot 10^{-6}$
A 309. . . .	62,5	62,48	70,73	$1{,}11 \cdot 10^{-5}$
A 311. . . .	75,0	62,35	70,37	$1{,}28 \cdot 10^{-5}$
A 308. . . .	100,0	62,18	69,65	$2{,}02 \cdot 10^{-5}$
A 307. . . .	200,0	65,24	72,09	$4{,}03 \cdot 10^{-5}$

Zusammenfassung.

1. Von den untersuchten 12 Verbindungen haben nur Polamidon und Hexalgon (1-Piperidino-3, 3-diphenyl-hexan-4-on, HBr) eine dem Morphin ähnliche, stark analgetische Wirkung.

2. Für Mäuse sind Polamidon und Hexalgon viel toxischer als Morphin.

3. Polamidon setzt die Erregbarkeit des Atemzentrums tiefer herab als Morphin. Am schwächsten wirkt das Hexalgon, daher dürfte es für den Menschen am wenigsten toxisch sein.

4. Polamidon und Hexalgon besitzen keine Brechwirkung an Hunden, bei denen das Morphin regelmäßig Erbrechen verursacht. Alle 3 Verbindungen lähmen schon in kleinen Dosen das Brechzentrum und verhindern das Apomorphinerbrechen.

5. Alle 12 Verbindungen besitzen eine dem Papaverin gleiche (myogene) spasmolytische Wirkung, die mit der Kapillaraktivität parallel zunimmt. Daneben ist auch eine atropinartige neurogene Wirkung nachzuweisen.

6. Intravenös gegeben verursachen Morphin, Polamidon und Hexalgon schon in kleinen Mengen Atemlähmung und transitorisch Blutdrucksenkung.

Literatur.

[1] Eisleb, O., u. Schaumann: Dtsch. med. Wschr. **65**, 967 (1939). — [2] Schaumann, O.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **196**, 109 (1940). — [3] Bockmühl, M., u. G. Erhart: Justus Liebigs Annalen der Chemie **561**, 52 (1948). — [4] Scott, C. C., u. K. K. Chen: J. of Pharm. a. exper. Therap. **87**, 65 (1946). — [5] Scott, C. C., K. K. Chen, K. G. Kohlsteadt, K. G. Robbins a. F. W. Israel: J. of Pharm. a. Exper. Therap. **91**, 147 (1947). — [6] Troxil, E. B.: J. Amer. Med. Ass. **136**, 920 (1948). — [7] Thorp, R. H., E. Waltner, u. D. Ofner: Nature **159**, 679 (1947). — [8] Chen, K. K.: Annals of the New-York Academy of Sciences **51**, 183 (1948). — [9] Loewy, A.: Pflügers Arch. **47**, 601 (1890). — [10] Impens, E.: Pflügers Arch. **78**, 527 (1899). — [11] Harnack, E.: Arch. exper Path. u. Pharmakol. **2**, 285 (1874). — [12] Guinard, L.: Etude exp. de pharmacodynamie comparée sur la morphine et l'apomorphine. Thése de Lyon 1898. — [13] Issekutz, B.: Pflügers Arch. **145**, 440 (1912) .— [14] Fromherz, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **173**, 86 (1933). — [15] Issekutz, B., M. Leinzinger u. B. Issekutz jr.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **176**, 8 (1934). [16] du Nouy: Michaelis Praktikum d. phys. Chemie 1930, S. 84.

Prof. Dr. B. Issekutz, Budapest VIII, Üllöi-Ut 26.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 305—310 (1950).

Aus der Medizinischen Klinik Kiel.

Kinetik der Hämiglobinbildung.

III. Mitteilung.

Hämiglobinbildung durch Nitrosobenzol in vivo.

Von

MANFRED KIESE und MARIA SOETBEER.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 17. Dezember 1949.)

Unsere Untersuchung der Wirkung des Phenylhydroxylamins und Nitrosobenzols in roten Zellen hat ergeben, daß die katalytische Hämiglobinbildung durch Phenylhydroxylamin durch einen Kreisprozeß bedingt wird, in welchem bei oder infolge der Oxydation des Phenylhydroxylamins durch Sauerstoff zu Nitrosobenzol Hämiglobin gebildet und das Nitrosobenzol wieder enzymatisch zu Phenylhydroxylamin reduziert wird[1]. Mit Nitrosobenzol war der Kreisprozeß ebenso in Gang zu setzen wie mit Phenylhydroxylamin. Nach seinen Messungen der Hämiglobinbildung in Katzen und Ratten durch Phenylhydroxylamin und

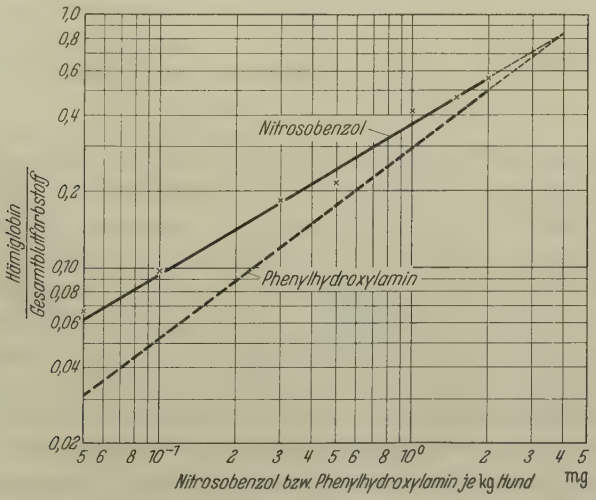


Abb. 1. Maximale Hämiglobinkonzentration im Blute des Hundes als Bruchteil des Gesamtblutfarbstoffes in Abhängigkeit von der i.v. injizierten Dosis Nitrosobenzol bzw. Phenylhydroxylamin. Abszisse und Ordinate logarithmisch geteilt.

Nitrosobenzol erörterte JUNG[2] und ebenso auch HEUBNER[3] bereits die Möglichkeit dieses Kreisprozesses. Da JUNG[2] nach intraperitonealer Injektion öliger Lösungen in Katzen durch 2,5 mg Phenylhydroxylamin je Kilogramm Tier im Mittel eine Hämiglobinkonzentration von 9,3 g je 100 ml Blut, durch die gleiche Dosis Nitrosobenzol aber nur 7,3 g Hämiglobin je 100 ml Blut und entsprechend in Ratten durch 5 mg Phenylhydroxylamin je Kilogramm Tier 8,3 g Hämiglobin je 100 ml Blut und nur 5,5 g durch die gleiche Dosis Nitrosobenzol erzielte, hielt er seine Messungen nicht für einen sicheren Beweis des Kreisprozesses und HEUBNER[4] betrachtete sie schließlich als ein Argument gegen den Kreisprozeß Phenylhydroxylamin-Nitrosobenzol als Mechanismus der katalytischen Hämiglobinbildung. Da unsere Messungen an roten Zellen in vitro den Beweis erbrachten, daß unter diesen Bedingungen der Kreisprozeß existiert, haben wir die Hämiglobinbildung durch Nitrosobenzol im Tier nochmal gemessen.

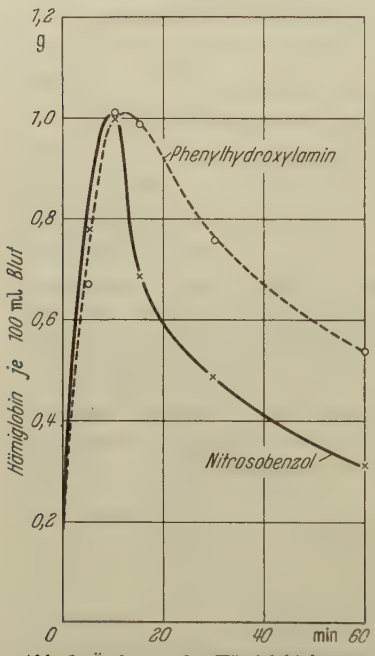


Abb. 2. Änderung der Hämiglobinkonzentrationen in Hunden nach i.v. Injektion von 0,05 mg Nitrosobenzol und 0,1 mg Phenylhydroxylamin je Kilogramm Hund. Die eingetragenen Punkte sind die Mittel aus je 8 Versuchen. ×--×--×-- Nitrosobenzol, 0--0--0-- Phenylhydroxylamin.

In Abb. 1 ist die im Hund erreichte Hämiglobinkonzentration in Abhängigkeit von der intravenös injizierten Dosis Nitrosobenzol dargestellt und zum Vergleich das Ergebnis unserer früheren Messungen der Wirkung des Phenylhydroxylamins[5].

Während sich für große Dosen, die die Hämiglobinkonzentration auf etwa die Hälfte der Konzentration des Gesamtblutfarbstoffes erhöhen, fast gleiche Wirkungsstärke von Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol ergibt, ist das Nitrosobenzol in kleinen Dosen sogar etwa doppelt so stark wirksam wie Phenylhydroxylamin. Der gleiche Unterschied ergibt sich, wenn die Hämiglobinkonzentration als Bruchteil der Gesamtblutfarbstoffkonzentration gemessen wird. Das Nitrosobenzol ist jedenfalls nicht schwächer wirksam als Phenylhydroxylamin, und damit erhält die Annahme eines Kreisprozesses zwischen Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol eine weitere wichtige Stütze.

Die größere Wirkungsstärke des Nitrosobenzols ist vielleicht aus der Kinetik des Kreisprozesses zu verstehen. Das Gift liegt in den roten

Zellen zum größten Teil als Nitrosobenzol gebunden an Hämoglobin, also als Nitrosobenzolhämoglobin, vor und ist dadurch gegen die Entartungsreaktion je einer Molekel Nitrosobenzol und Phenylhydroxylamin zu Azoxybenzol geschützt. Wird das Gift als Nitrosobenzol ins Blut gegeben, so kann es sofort die Verbindung mit Hämoglobin eingehen. Wird es als Phenylhydroxylamin zugesetzt, so wird dieses zunächst zu Nitrosobenzol oxydiert. Im Verlauf dieser ersten Oxydation ist Phenylhydroxylamin gleichzeitig mit Nitrosobenzol in weit höheren Konzentrationen vorhanden als später während des eigentlich enzymatisch betriebenen Kreisprozesses. Dadurch kann ein Teil des Giftes zu Azoxy-

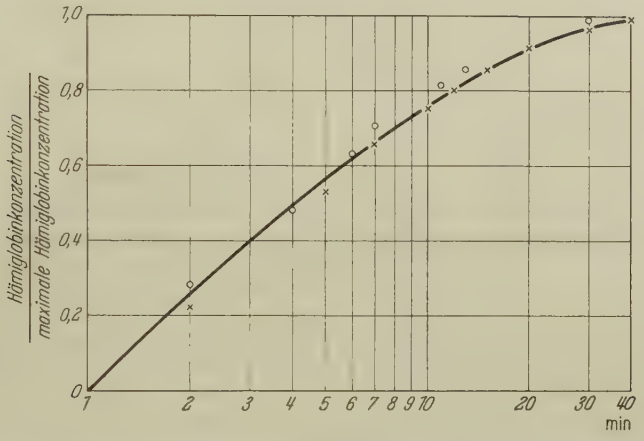


Abb. 3. Anstieg der Hämiglobinkonzentration im Blute des Hundes nach i.v. Injektion von 1,5 mg Nitrosobenzol bzw. 1,5 mg Phenylhydroxylamin je Kilogramm Tier. Abszisse logarithmisch geteilt; ooo Nitrosobenzol; × × × Phenylhydroxylamin.

benzol entarten, bevor er überhaupt im Kreisprozeß zur Wirkung kam. Wahrscheinlich kann das reaktionsfähige Phenylhydroxylamin auch noch durch andere Reaktionen dem Kreisprozeß verloren gehen.

Ein weiterer Unterschied in der Wirkung von Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol ist in Abb. 2 aufgezeigt. Nach der Injektion von 0,05 mg/kg Nitrosobenzol und 0,1 mg/kg Phenylhydroxylamin wird die gleiche maximale Hämiglobinkonzentration (1 g Hämiglobin/100 ml Blut) erreicht, aber nach der Injektion von Nitrosobenzol sinkt die Hämiglobinkonzentration schneller wieder ab als nach der Injektion von Phenylhydroxylamin. 5, 20 und 50 min nach dem Maximum ergaben sich Konzentrationsdifferenzen, die größer sind als deren 3fache Streuung. Demnach müßte das Phenylhydroxylamin zunächst zum Teil in eine Verbindung übergehen, die selbst schwächer und länger wirkt oder aus der es langsam wieder freigesetzt wird.

Versuche.

A. Methoden. Die Untersuchungen wurden ganz entsprechend den früheren mit Phenylhydroxylamin an Hunden durchgeführt[5]. Nitrosobenzol wurde aus Phenylhydroxylamin durch Oxydation mit Chromsäure hergestellt, mit Wasserdampf abgetrennt und aus Alkohol umkristallisiert. Da seine Löslichkeit in Wasser nicht ausreicht, um die erforderlichen Mengen in den zulässigen Mengen isotoner Kochsalzlösung zu lösen, wurden die zu injizierenden Dosen zunächst in 1 ml Azeton gelöst. Unmittelbar vor der intravenösen Injektion wurden 4 ml isotoner Natriumchloridlösung zugesetzt und dieses Gemisch im Laufe einer Minute intravenös injiziert.

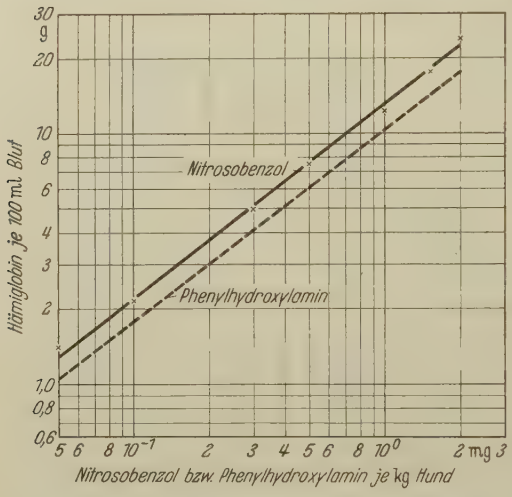


Abb. 4. Je 100 ml Blut im Hunde gebildete Hämiglobinmenge in Abhängigkeit von der i.v. injizierten Dosis Nitrosobenzol bzw. Phenylhydroxylamin. Abszisse und Ordinate logarithmisch geteilt.

B. Ergebnisse. Nach der intravenösen Injektion von Nitrosobenzol stieg die Hämiglobinkonzentration im Blute der Hunde schneller an als nach Injektion der gleichen Dosis Phenylhydroxylamin und erreichte auch — wie in der Abb. 1 bereits belegt ist — einen höheren Wert. Der Anstieg der Hämiglobinkonzentration wird jedoch in beiden Fällen von den gleichen Faktoren bestimmt. In Abb. 3 ist die Zunahme der Hämiglobinkonzentration, ausgedrückt als Bruchteil der maximal erreichten, nach Injektion von 1,5 mg Nitrosobenzol bzw. Phenylhydroxylamin dargestellt und zeigt in dieser Darstellung eine sehr ähnlichen Ablauf.

Die für den Vergleich mit der Wirkung des Phenylhydroxylamins wesentlichen Messungsergebnisse und errechneten Größen sind in Tab. 1 als Mittel der in den Versuchen mit der gleichen Dosis erhaltenen Daten wiedergegeben. Aus diesen Daten (vgl. auch Abb. 1) ergeben sich für die Abhängigkeit der Wirkungsstärke des Nitrosobenzols von der Dosis die Potenzfunktionen $W_s = 6{,}5 \times D^{o,65}$ [W_s = Wirkungsstärke ($gHb^{III}/100$ ml Blut), D = Dosis (mg/kg)] und $W_{sr} = 40 \times D^{o,65}$ [W_{sr} = Wirkungsstärke (Hämiglobin/Gesamtblutfarbstoff $\times$ 100), D = Dosis (mg/kg)].

Die errechneten Wirkungsgrößen des Nitrosobenzols, also die je 100 ml Blut während der ganzen Wirkungsdauer gebildeten Mengen Hämi-

globin, übertreffen die des Phenylhydroxylamins ebenfalls. In Abb. 4 ist die Abhängigkeit der je 100 ml Blut gebildeten Hämiglobinmenge von der Dosis Nitrosobenzol und Phenylhydroxylamin veranschaulicht. Entsprechend der etwas größeren Wirkung des Nitrosobenzols sind auch die Mindestzahlen für die je Molekel Nitrosobenzol gebildeten Äquivalente Hämiglobin ein wenig größer als beim Phenylhydroxylamin. Die Wirkungsgrößen sind in gleicher Weise errechnet wie in früheren Untersuchungen[5, 6, 7], nämlich unter der Annahme einer normalen Reduktionsgeschwindigkeit des Hämiglobins in den roten Zellen. Da aber Phenylhydroxylamin auch Hämiglobin reduziert, beschleunigt es die enzymatische Reduktion des Hämiglobins, und die angegebenen Wirkungsgrößen und damit auch die von jedem Mol Nitrosobenzol geleisteten Umsätze sind Minimalwerte, die unter den wahren Werten liegen. Wir werden diese Werte, wenigstens ihre Größenordnung, nach der Beschreibung der Kinetik der einzelnen Teilreaktionen des Kreisprozesses noch erörtern.

Tabelle 1. *Größte Erhöhung der Hämiglobinkonzentration und je 100 ml Blut gebildete Hämiglobinmenge nach intravenöser Injektion von Nitrosobenzol in Dosen von 0,05—2,0 mg/kg im Hunde.* (Die genannten Werte sind die Mittel und die Streuung des Mittels.)

Zahl der Versuche	Dosis Nitrosobenzol mg/kg	Nitrosobenzol-Konz. im Blute Mol/l	Maximale Erhöhung der Hämiglobinkonzentration		Gebildete Hämiglobinmenge		Äq Hämiglobin/Mol Nitrosobenzol	Zeitpunkt der höchsten Hbrr Konz. min
			g/100 ml	% des GesamtHb.	g/100 ml Blut	Äq/l Blut		
8	0,05	$0{,}6\times10^{-5}$	$1{,}0 \pm 0{,}08$	$6{,}6 \pm 0{,}7$	1,4	$0{,}8\times10^{-3}$	140	7
5	0,1	$1{,}2\times10^{-5}$	$1{,}5 \pm 0{,}1$	$9{,}6 \pm 1{,}0$	2,2	$1{,}3\times10^{-3}$	110	11
4	0,3	$3{,}5\times10^{-5}$	$3{,}3 \pm 0{,}15$	$19{,}3 \pm 0{,}7$	5,1	$3{,}0\times10^{-3}$	86	22
5	0,5	$5{,}8\times10^{-5}$	$3{,}8 \pm 0{,}4$	$22{,}2 \pm 2{,}7$	7,4	$4{,}3\times10^{-3}$	73	30
3	1,0	$1{,}2\times10^{-4}$	$6.0 \pm 0{,}1$	$42{,}3 \pm 2{,}7$	11,1	$6{,}5\times10^{-3}$	56	30
3	1,5	$1{,}8\times10^{-4}$	$8{,}6 \pm 0{,}7$	$47{,}3 \pm 2{,}2$	16,8	$9{,}9\times10^{-3}$	56	32
3	2,0	$2{,}3\times10^{-4}$	$9.6 \pm 0\,3$	$56{,}3 \pm 2{,}8$	23,8	$14{,}0\times10^{-3}$	59	30

Für die statistische Bewertung des Unterschieds der Wirkungsstärke von Nitrosobenzol und Phenylhydroxylamin bevorzugen wir die maximale Hämiglobinkonzentration als Bruchteil des Gesamtblutfarbstoffes. Da die durch eine Dosis Nitrosobenzol oder Phenylhydroxylamin bestimmte Hämiglobinkonzentration ein Fließgleichgewicht darstellt, das von enzymatischen Vorgängen in den roten Zellen abhängt, sind die an verschiedenen Tieren mit ungleichem Gehalt des Blutes an roten Zellen und Blutfarbstoff gewonnenen Ergebnisse in diesem Maß besser vergleichbar als unmittelbar in der Hämiglobinkonzentration. In der Tab. 2 sind die Daten für die Wirkungsstärke von 0,05 bzw. 0,1 und 1,0 mg

Tabelle 2. *Differenz der Wirkungsstärke von Nitrosobenzol und Phenylhydroxylamin in Dosen von 0,05, 0,1 und 1,0 mg/kg.* Wirkungsstärke angegeben als maximale Hämiglobinkonzentration als Bruchteil der Gesamtblutfarbstoffkonzentration (Daten für Phenylhydroxylamin nach Kiese und Soetbeer[5]).

Dosis mg/kg	Wirkungsstärke (Hämiglobin/Gesamtblutfarbstoff × 100)		Differenz der Wirkungsstärke
	Nitrosobenzol	Phenylhydroxylamin	
0,05	6,6 ± 0,7	3 ± 0,3	3,8 ± 0,76
0,1	9,6 ± 1,0	5 ± 1,0	4,6 ± 1,4
1,0	42,2 ± 2,7	31 ± 3,1	11,3 ± 4,1

Nitrosobenzol und Phenylhydroxylamin je Kilogramm Hund sowie die Differenz der Wirkungsstärke zusammengestellt. Bei beiden Giften ist die Wirkungsstärke der Dosis nicht proportional, dennoch ist die Differenz der beobachteten Wirkungsstärke der genannten Dosen dreimal so groß wie ihre Streuung, also nicht als zufällig zu betrachten.

Zusammenfassung.

In Dosen, die die Hämiglobinkonzentration in Hunden auf etwa die Hälfte des Gesamtblutfarbstoffs erhöhen, ist Nitrosobenzol nach intravenöser Injektion gleich stark wirksam wie Phenylhydroxylamin. In kleineren Dosen, die die Hämiglobinkonzentration nur auf etwa 10% des Gesamtblutfarbstoffes erhöhen, ist Nitrosobenzol doppelt so stark wirksam wie Phenylhydroxylamin. Die Ergebnisse bestätigen die Existenz des in vitro nachgewiesenen enzymatisch unterhaltenen Kreisprozesses Nitrosobenzol-Phenylhydroxylamin auch in vivo.

Literatur.

[1] Kiese, M., u. H. D. Waller: Vortrag Tagung d. Ges. d. physiol. Chem. Göttingen 1949. Ber. ges. Biol. B **139**, 228 (1950). — [2] Jung, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **195**, 208 (1940). — [3] Heubner, W.: Erg. Physiol. **43**, 9 (1940). — [4] Heubner, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 310 (1948). — [5] Kiese, M., u. M. Soetbeer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 426 (1949). — [6] Kiese, M.: Klin. Wschr. **1947**, 453. — [7] Kiese, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 361 (1949).

M. Kiese, Kiel, Feldstr. 12, Med. Univ.-Klinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 311—316 (1950).

Aus der wissenschaftlichen Abteilung der Chemischen Fabrik Dr. August Wolff, Bielefeld und den Krankenanstalten Bethel (Leit. Arzt: Prof. Dr. G. Schorsch).

Über die Beeinflussung der Krampferregbarkeit des Zentralnervensystems durch Novocain.

Von

Norbert Gerlich.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. Dezember 1949).

Seitdem das Novocain in der Therapie nicht mehr nur zur Lokalanästhesie benutzt wird, sondern auch bei solchen Erkrankungen, zu deren Behebung das Novocain über eine Umstimmung zu einer mehr ausgeglichenen Tonuslage des gesamten vegetativen Systems führen soll[1, 2], wurde der Angriffspunkt dieser Wirkung teils in die Peripherie[3, 4, 5], teils in das zentrale Nervensystem[6, 7] verlegt. Da aber ein experimenteller Beweis für die zentrale Wirkung noch nicht erbracht wurde, wie auch Soehring[3] in seiner zusammenfassenden Arbeit darlegt, wollten wir versuchen nachzuweisen, ob und welchen Einfluß das Novocain auf die Krampferregbarkeit besitzt, wobei wir zu diesem Zwecke zunächst voraussetzen wollen, daß die Beeinflussung der Krampferregbarkeit des ZNS im allgemeinen wohl meistens auch einen zentralen Angriffspunkt eines Pharmakons bedingt.

Die Bestimmung der Krampferregbarkeit geschah mit Hilfe der Elektrokrampfmethode[8], die sich besonders zur Bestimmung und des Nachweises solcher Arzneistoffe gut eignet, die die Krampferregbarkeit herabsetzen[9].

Gelingt es, eine Beeinflussung der Krampfbereitschaft durch Nococain darzustellen, so wird die zweite Frage lauten müssen, wie groß die Dosen sind, die eine solche Beeinflussung hervorrufen, insbesondere aber, ob diese Dosen nicht bereits toxisch wirken. Im Falle einer Wirkung auf die Krampferregbarkeit des ZNS muß weiterhin festgestellt werden, ob und in welcher Weise sich das Elektrokrampfbild unter Novocain ändert. Von gewisser Bedeutung erschien uns ferner die Frage, wie sich wohl die Novocainwirkung auf die Krampferregbarkeit durch Adrenalin beeinflussen ließe. Diese Frage erscheint deswegen berechtigt, weil das Novocain eindeutig weder als sympatikotonisch noch als parasympatikotonisch-wirkender Stoff angesprochen werden kann.

Schließlich wollten wir noch beobachten, welchen Einfluß gleichzeitige Gaben von Barbitursäurepräparaten, insbesondere Luminal auf den Novocaineffekt entfalten. Luminal setzt ja schon in subnarkotischen Dosen die elektrische Krampferregbarkeit herab[9] und wurde andererseits von GOODMAN und GILMANN[10] als antagonistisch wirkende Substanz bei akuten zerebralen Novocainvergiftungen angegeben, also zur Behandlung zerebraler Erregungszustände des Novocains.

Versuchsanordnung: Als Versuchstiere dienten uns gesunde männliche Meerschweinchen (MS) im Gewicht von 480—560 g, die mit gelben Rüben, Heu und Hafer ernährt wurden. Die Tiere wurden gewichtsmäßig so auf die Versuchsgruppen verteilt, daß die zu vergleichenden Gruppen etwa das gleiche Durchschnittsgewicht aufwiesen, und die Einzelgewichte nicht mehr als höchstens $\pm$ 30 g vom Durchschnittsgewicht differierten. Während der Versuchsdauer erhielten die Tiere kein Futter.

Das Novocain wurde in 5%iger Lösung s. c. verabfolgt, Adrenalin als Suprarenin ebenfalls s. c. in der Verdünnung 1:10000 und Luminal als Luminal-Natrium in 1%iger Lösung s. c. Sämtliche Lösungen wurden durch Zugabe von Natriumchlorid p. a. isoton gemacht.

Als Maß der Krampferregbarkeit bestimmten wir diejenige Wechselstromspannung, die bei Querdurchströmung des Tierkopfes von Schläfe zu Schläfe bei konstanter Frequenz, Stromstärke, Reizzeit, Reizintervall sowie konstanter Anfangsspannung und Potentialzuwachses gerade eben einen Krampf auszulösen imstande ist. Diese Prinzipien sind bereits von uns mitgeteilt worden[8, 11]. Die Anfangswerte der Krampfschwellen wurden stets eine Stunde vor der Novocaininjektion bestimmt. Die Adrenalindosis hingegen wurde infolge der kurzen Wirkungsdauer des Adrenalins erst 15 Min vor dem nächstfolgenden Stundenwert verabfolgt. Eine halbe Stunde nach der Novocaingabe und hernachfolgend jede weitere Stunde wurde die elektrische Krampfauslösung wiederholt. Der Potentiometerwiderstand der Reizapparatur war mit 10000 Ohm dimensioniert, die am Potentiometer angelegte Wechselspannung belief sich auf 220 Volt, die Frequenz betrug 50 Hz. Als Reizzeit wählten wir $t = {}^{16}/_{20}$ sec. Die Anfangsreizspannung war jeweils 60 Volt, der Potentialzuwachs von Einzelreiz zu Einzelreiz 5 Volt.

Versuchsergebnisse und Besprechung.

In einem ersten Versuch prüften wir die Wirkung verschiedener Dosen Novocain bei s. c. Applikation auf die Elektrokrampfschwellen männlicher Meerschweinchen. Die Abb. 1 zeigt das Ergebnis.

In der Dosierung 0,15 g/kg bis 0,075 g/kg beeinflußt das Novocain tatsächlich die Krampferregbarkeit und zwar kommt es zu einer nicht sehr lang anhaltenden Herabsetzung. Die Krampfspannung mußte von einem durchschnittlichen Anfangswert von 85 Volt auf 125 Volt heraufgesetzt werden. 50 mg/kg Novocain riefen praktisch noch keine Wirkung hervor. Es handelt sich um recht erhebliche Mengen, die, wenn ein Vergleich mit der beim Menschen üblichen Dosierung erlaubt ist, zweifelsohne recht weit über den therapeutischen Dosen liegen. Wenn wir mit SCHAUMANN[12] sprechen, daß das erste Organ, das in Mitleidenschaft gezogen wird, wenn ein Lokalanästhetikum in größerer Menge in den allgemeinen Kreislauf gelangt, ebenso wie bei der Narkose das ZNS sei,

so müßte der dargestellte Effekt des Novocains tatsächlich eine zentrale Wirkung wiedergeben. Diese Erklärung würde auch mit der von uns eingangs angeführten Voraussetzung übereinstimmen, daß die Beeinflussung der Krampferregbarkeit des ZNS im allgemeinen auch einen zentralen Angriffspunkt eines Pharmakons voraussetzt.

Das Elektrokrampfbild zeigte unter der Novocainwirkung eine deutliche Veränderung. Bei Dosen, die gerade eben die Krampfschwellen erhöhten, war der klonische Krampfcharakter nur mehr angedeutet, bei 150 mg/kg Novocain war überhaupt keine klonische Krampfphase mehr wahrnehmbar. Im wesentlichen wurde ein mehr oder weniger deutlicher tonischer Krampfzustand mit anschließendem, stark verlängertem Erschlaffungsstadium festgestellt. Steifbeiniges Aufrichten der Tiere und fluchtartiges Davonrennen, wie wir es oft bei Normaltieren im Gefolge des Krampfes sehen, wurde unter Novocain niemals beobachtet. Bei einzelnen Tieren war bei 150 mg/kg die Krampfschwellenbestimmung schwierig durchzuführen, da auch das tonische Krampfmoment nicht mehr sehr deutlich zu erkennen war. Bei abklingender Novocainwirkung kehrte bei diesen Tieren zunächst das tonische Krampfbild wieder, hernach schließlich auch wie bei den anderen Tieren der klonisch-tonische Krampfcharakter. In dieser Hinsicht verhält sich das Novocain wie jedes andere Narkotikum.

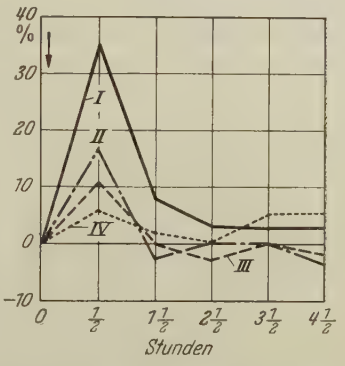


Abb. 1. Wirkung verschiedener Dosen Novocain auf die Krampfschwellen männl. Meerschweinchen. Durchschnittwerte von je 10 männl. Meerschweinchen im Gewicht von 520 bis 560 g. Angabe der Krampfschwellen in % der Anfangsvoltzahlen. Wechselstrom von 50 Hz, 10000 Ω Potentiometerwiderstand, Reizzeit 16/20. Anfangsspannung 60 Volt, Potentialzuwachs 5 Volt. I. 0,15 g/kg s.c. Novocain; II. 0,1 g/kg s.c. Novocain; III 0,075 g/kg s. c. Novocain; IV. 0,05 g/kg s. c. Novocain.

Da das Novocain sowohl parasympaticotonische als auch besonders sympatikotonische Wirkungen zu entfalten vermag, untersuchten wir in einem 2. Versuch den Einfluß von Adrenalin bei s. c. Gabe auf die oben dargestellte Novocainwirkung. Wir gingen dabei so vor, daß wir den Tieren 15 min nach der Novocaingabe, also auch 15 min vor der halbstündigen Elektrokrampfung jeweils 0,1 mg/kg Suprarenin s. c., und zwar an anderer Hautstelle injizierten. Die Abb. 2 gibt das Ergebnis dieses Versuchs wieder.

Wir entnehmen aus diesen Kurven, daß das Adrenalin die, selbst durch eine große Dose Novocain zu erwartende Herabsetzung der Krampferregbarkeit bis zu einem gewissen Grade aufzuheben vermag. Adrenalin selbst, vermag die Krampfschwellen etwas zu vermindern, erhöht also in geringem Ausmaß die Krampfbereitschaft. An Hand dieses Versuchsergebnisses wäre zu überlegen, ob die zwar bestehende, aber doch sehr geringe zentral erregende Wirkung des Adrenalins auslangt, um die gegen Krämpfe gerichtete Wirkung des Novocains, soll sie zentral bedingt sein, in einem solchen Ausmaß zu unterdrücken.

Um diese Frage näher zu untersuchen, mußten wir zunächst feststellen, ob diese Dose Adrenalin (0,1 mg/kg) in der Lage ist, die Wirkung eines gegen Krämpfe gerichteten Arzneistoffes, nämlich des Luminals, das ja einen zentralen Angriffspunkt besitzt, ebenfalls zu beeinflussen. Die Abb. 3 gibt das Versuchsergebnis wieder.

Die hier gewählte Adrenalindosierung von 0,1 mg/kg MS. beeinflußt nur in geringem Ausmaße die Krampferregbarkeitsherabsetzung des Luminals, weniger als die des Novocains. Das kann einmal bedeuten, daß in dieser Hinsicht das Adrenalin gegenüber dem Novocain stärker antagonistisch wirkt als gegenüber dem Luminal, oder aber man müßte annehmen, daß der beobachtete Novocaineffekt auf die Krampferregbarkeit

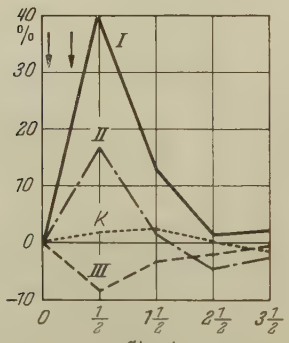


Abb. 2.

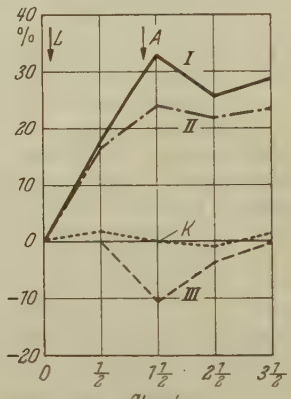


Abb. 3.

Abb. 2. Wirkung von Novocain und Adrenalin auf die Krampfschwellen männl. Meerschweinchen. Durchschnittswerte von je 10 männl. Meerschweinchen im Gewicht von 490—545 g Angabe der Krampfschwellen in % der Ausgangswerte. Wechselstrom von 50 Hz, 10000 Ω Potentiometerwiderstand, Reizzeit 16/20. Anfangsspannung 60 Volt, Potentialzuwachs 5 Volt. I. 0,15 g/kg Novocain s. c.; II. 0,15 g/kg Novocain s. c. + 0,1 mg/kg Adrenalin s. c. (15 min nach Novocaininjektion appliziert); III. 0,1 mg/kg Adrenalin s. c. (von den Stundenwerten der Abszisse sind hier jeweils 15 min abzuziehen); *K* Kontrolltiere ohne Medikation.

Abb. 3. Einfluß des Adrenalins auf die gegen Krämpfe gerichtete Wirkung des Luminals. Durchschnittswerte von je 10 männl. Meerschweinchen im Gewicht von 480—505 g. Angabe der Krampfschwellen in % des Ausgangswertes. Die Adrenalingabe erfolgte s. c. ¼ Std vor Bestimmung des 1½ Std-Krampfwertes. Wechselstrom von 50 Hz, 10000 Ω Potentiometerwiderstand, Reizzeit 16/20, Anfangsspannung 60 Volt, Potentialzuwachs 5 Volt. I. 35 mg/kg Luminal-Na s. c.; II. 35 mg/kg Luminal-Na s. c. + 0,1 mg/kg Adrenalin s. c.; III. 0,1 mg/kg Adrenalin s. c.; *K* Kontrolltiere ½ 0,9% NaCl-Lösung s. c.

tatsächlich eben nur teilweise Ausdruck eines zentralen Angriffspunktes des Novocains ist. Zur weiteren Betrachtung dieser Fragestellung mußten wir feststellen, ob sich etwa diese Novocainwirkung mit der gegen Krämpfe gerichteten Wirkung von zentral angreifenden Arzneistoffen addieren oder sogar potenzieren läßt. Zu diesem Zwecke prüften wir bei gleichzeitiger Gabe die Wirkung verschiedener Dosen von Novocain mit verschiedenen Dosen von Luminalnatrium. Die Abb. 4 und 5 zeigen die Ergebnisse.

Der Versuch der Abb. 4 mit nur 15 mg Luminalnatrium/Kilogramm weist besonders bei der Novocaingabe von 0,15 und 0,075 g/kg eine deut-

liche Wirkungsverstärkung nach. Abb. 5 lehrt uns, daß bei 35 mg/kg Luminal durch gleichzeitige Novocaingaben von sogar 0,2 oder 0,1 g/kg keine weitere wesentliche Wirkungsverstärkung erzielt wird. Allerdings ist dabei die überhöhende Wirkung des Novocains verlängert. Eine bedeutendere Wirkungsverstärkung durch Novocain hätte sich bei der Elektrokrampfmethode sofort in der Weise geäußert, daß die Krampfschwellen nicht mehr bestimmbar gewesen wären. Das tonische Krampfmoment wäre dann in Fortfall gekommen, d. h. also, daß bei den hier gewählten Dosen an Novocain und Luminal eine Narkose nicht erzielt wurde. (Denn der Beginn einer Narkose läßt sich gerade mit der Elektro-

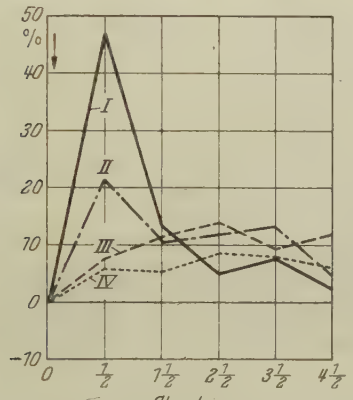


Abb. 4.

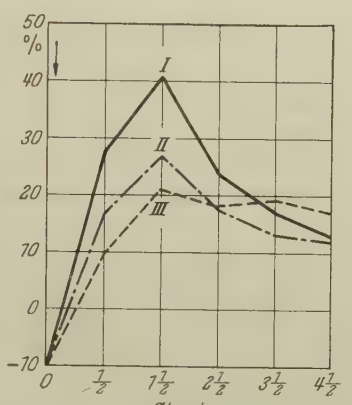


Abb. 5.

Abb. 4. Wirkung verschiedener Dosen von Novocain und geringer Luminal-Na-Dosen bei gleichzeitiger s. c. Applikation. Durchschnittswerte von je 10 männl. Meerschweinchen im Gewicht von 500—550 g. Angabe der Krampfschwellen in % des Ausgangswertes. Wechselstrom von 50 Hz, 10000 Ω Potentiometerwiderstand, Reizzeit 16/20, Anfangsspannung 60 Volt, Potentialzuwachs 5 Volt. I. 0,15 g/kg Novocain + 15 mg/kg Luminal-Na s. c.; II. 0,075 g/kg Novocain + 15 mg/kg Luminal-Na s. c.; III. 0,05 g/kg Novocain + 15 mg/kg Luminal-Na s. c.; IV. 15 mg/kg Luminal-Na s. c.

Abb. 5. Wirkung verschiedener Dosen Novocain und größerer Luminal-Na-Dosen bei gleichzeitiger s. c. Applikation. Durchschnittswerte von je 10 männl. Meerschweinchen im Gewicht von 480—520 g. Angabe der Krampfschwellen in % des Ausgangswertes. Wechselstrom von 50 Hz, 10000 Ω Potentiometerwiderstand. Reizzeit 16/20, Anfangsspannung 60 Volt, Potentialzuwachs 5 Volt. I. 0,2 g/kg Novocain + 35 mg/kg Luminal-Na s. c.; II. 0,1 g/kg Novocain + 35 mg/kg Luminal-Na s. c.; III. 35 mg/kg Luminal-Na s. c.

krampfmethode leicht erkennen, da nach anfänglicher beträchtlicher Krampfschwellenerhöhung weiterhin eine Krampfauslösung trotz Zunahme der Spannungs- und Stromwerte nicht mehr möglich ist[9].)

Wir sind geneigt anzunehmen, daß das Novocain, sofern es selbst bei hoher Dosierung vorwiegend zentral angreifen würde, tatsächlich mindestens in Kombination mit einem zentral lähmenden Pharmakon auch ein narkotisches Stadium hervorrufen müßte. Wenn man bedenkt, daß das Novocain infolge seiner Beeinflussung des vasoneurotischen Systems veränderte lokale Durchblutungsverhältnisse auch im Hirn bedingen wird, so kann sich zweifelsohne auf Grund solcher veränderter

Durchblutungsgrößen auch eine veränderte Krampferregbarkeit ergeben, die einerseits sowohl durch Adrenalin beeinflußt werden, als auch andererseits die Wirkung eines zentral angreifenden Pharmakons verstärken kann. Diese Erklärung schließt aber nicht aus, daß die bei hohen Novocaingaben feststellbare Wirkung auf die Krampferregbarkeit mindestens teilweise auf eine zentrale Wirkung (also nicht nur über den Umweg einer lokalen Durchblutungsveränderung) zurückgeführt werden kann. Dies um so mehr, als Adrenalin selbst bei noch höheren Gaben den Novocaineffekt auf die Krampferregbarkeit niemals vollständig zu unterdrücken vermag.

Zusammenfassung.

1. Mit Hilfe der Elektrokrampfmethode wird die Wirkung des Novocains auf die Krampferregbarkeit männlicher Meerschweinchen untersucht.

2. Es bewirkt bei s. c. Applikation hoher Dosen eine nicht sehr lang anhaltende Herabsetzung der Krampferregbarkeit. Die Dosen sind vergleichsweise wesentlich größer als die beim Menschen üblichen Gaben.

3. Das Krampfbild wies nach Novocain die gleichen Veränderungen auf, wie bei Anwendung des Luminals.

4. Adrenalin vermag den Novocaineffekt auf die Krampferregbarkeit bis zu einem gewissen Grade zu unterdrücken. Dieser Ausgleich gelingt nur unvollständig, ist aber größer als nach dem geringen zentral erregenden Effekt des Adrenalins z. B. gegenüber Luminal als bei reinem zentralem Angriffspunkt des Novocains zu erwarten sein dürfte.

5. Die Kombination verschiedener Dosierungen von Novocain und Luminal zeigte teilweise einen additiven Effekt.

6. Auf Grund der Versuchsergebnisse wird geschlossen, daß der Novocaineffekt wenigstens teilweise auf einen zentralen Angriffspunkt zurückgeführt werden kann. Im übrigen dürfte die auf das vasoneurotische System gerichtete Wirkung des Novocains die lokalen Durchblutungsverhältnisse auch des Gehirns in der Weise beeinflussen, daß eine Veränderung der Krampferregbarkeit resultiert.

Literatur.

[1] Ritter, U.: Dtsch. Gesundheitswesen IV, 815 (1949). — [2] Rohkrämer, H.: Z. f. ges. inn. Med. **1948**, Nr. 17/18. — [3] Soehring, K.: Pharmacie **4**, 361 (1949). — [4] Haas, H. T. A.: Klin. Wschr. **24/25** 353 (1947). — [5] Hazard, R.: Progrès Médical **1943**, 335. — [6] Bigelow, N., u. J. Harrison: Pharmacol (Amer.). **81**, 368 (1944). — [7] Bosse, U., u. H. Rohkrämer: Ärztl. Forschung **1**, 162 (1947). — [7] Gerlich, N.: Verh. Dtsch. Pharmakolog. Ges. Hamburg 1947. — [9] Gerlich, N.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 294—295 (1949). — [10] Goodman, L., u. A. Gilman: The Pharmalogical Basis of Therapeutics (1946), New York. — [11] Gerlich, N.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 160—161 (1949). — [12] Schaumann, O.: Verh. Dtsch. Pkarmakol. Ges. Berlin 1938.

Dr. N. Gerlich, Wissenschaftl. Abt. d. chem. Fabr. Dr. A. Wolff, Bielefeld.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 317—327 (1950).

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. K. Matthes).

Über die Änderungen der Anspannungs- und Austreibungszeit sowie der physikalischen Kreislaufgrößen nach Sympatol, Veritol und Ephedrin beim gesunden Menschen.

Von

K. Mechelke, F. Baumgärtner und A. Guttmann.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 12. Januar 1950.)

Bei Untersuchungen der Sympathikomimetika mit fortlaufend registrierenden Methoden konnte Matthes[1] bei allen Substanzen grundsätzlich eine zweiphasische Wirkung feststellen.

In der Initialphase kommt es als Folge des vermehrten venösen Rückstromes zu einer Tachykardie. Mit Abfall des Venendruckes und Normalisierung der Pulsfrequenz und weiterem Anstieg des systolischen Blutdruckes werden pressorezeptorische Reflexe wirksam, die eine sekundäre Bradykardie bedingen.

Aus der Tab. 1 von Matthes[1] ist ersichtlich, daß der Anstieg des systolischen Blutdruckes bei Adrenalin, Sympatol und Ephedrin etwa gleich schnell erfolgt und bei Veritol deutlich verzögert ist. Ephedrin führt zu einer besonders anhaltenden Blutdrucksteigerung. Die initiale Pulsfrequenzzunahme ist beim Adrenalin am stärksten, weniger stark beim Sympatol ausgeprägt. Nach Veritol- und Ephedringabe tritt sie nur geringgradig auf. Die sekundäre Bradykardie dagegen wird am deutlichsten beim Sympatol und Veritol beobachtet. Nach Adrenalin, Sympatol und Ephedrin tritt die Vasokonstriktion besonders kräftig auf, schwächer ist sie beim Veritol. Von Böger, Deppe und Wezler[2] wurde in zahlreichen Versuchen die Dynamik des Kreislaufs nach Gabe von Sympathikomimetika untersucht. Sie konnten feststellen, daß die Blutdrucksteigerung durch sehr unterschiedliche Änderungen der physikalischen Kreislaufgrößen verursacht werden kann. Sie beobachteten nach den Sympathikomimetika einphasische und mehrphasische Reaktionsabläufe. Gleichzeitige Bestimmungen der Anspannungs- und Austreibungszeit und der physikalischen Kreislaufgrößen nach Sympathikomimetika sind bisher nicht ausgeführt worden.

Nach Veritol fand Blumberger[3] eine verkürzte Anspannungszeit bei wechselndem Verhalten der Austreibungszeit. Die relative Austreibungszeit wurde von Pohle und Sarre[4] beim Gesunden nach Veritol verkürzt gefunden. Nach i.m. Injektion von 120 mg Sympatol fanden Sarre und Herzig[5] bei Herzgesunden und Herzkranken eine Verkürzung der Anspannungszeit, deren Grad etwa derjenigen nach Digitalis-Präparaten bei Herzkranken entsprach. Die Austreibungszeit fanden sie meistens wie nach Digitalis und Strophantin verlängert. Sie glauben, daß diese Befunde auf eine echte inotrope Wirkung des Sympatols schließen lassen, wie sie bei Digitalis angenommen wird.

Die Verkürzungen der Anspannungs- und Austreibungszeit, die wir nach Adrenalin feststellen konnten, erklärten wir mit einer positiven inotropen Wirkung des Adrenalins auf den Herzmuskel. Ob diese Wirkung auf den Kontraktionsmechanismus des Herzens direkt durch das Adrenalin oder auf dem Umwege einer reflektorischen Acceleransreizung ausgelöst wird, läßt sich beim Menschen nicht erweisen. Unsere Befunde ließen weiterhin an eine Änderung des Elastizitätsmoduls des Herzmuskels selbst denken, die als Folge der mit der Frequenzsteigerung wirksam werdenden Relaxation einsetzt (Mechelke und Nusser[6]). Auf die Verschiebung der isotonischen Kontraktionsminima bei Frequenzsteigerung hat Broemser[7] besonders hingewiesen.

Ziel vorliegender Untersuchungen sollte es sein, festzustellen, ob bei den Sympathikomimetika Sympatol, Veritol und Ephedrin in ähnlicher Weise übereinstimmende Veränderungen der Anspannungs- und Austreibungszeit auftreten, wie sie auf Grund der mit den fortlaufend registrierenden Methoden erzielten Ergebnisse zu erwarten waren. Dabei interessierte uns die Frage, ob die Beeinflussung der Kontraktionsphasen des Herzmuskels allein eine Folge der Änderungen der physikalischen Kreislaufgrößen ist oder ob darüber hinaus eine positiv inotrope Wirkung der Sympathikomimetika anzunehmen ist.

Methodik.

Die Untersuchungen wurden an 5 herzgesunden Medizinstudenten durchgeführt. Die Ausführung der Registrierung und die Berechnung der physikalischen Kreislaufgrößen und der Anspannungs- und Austreibungszeit erfolgten in gleicher Weise wie bei den Privin-, Otrivin- und Adrenalinuntersuchungen (Mechelke und Nusser[6, 8]). Von den Sympathikomimetika wurden jeweils in 20 sec 45 mg Sympatol, 10 mg Veritol oder 37,5 mg Ephedrin i.v. injiziert. In 3 Versuchen wurde die Herzdynamik während der Initialphase fortlaufend bestimmt.

Ergebnisse.

Die Abb. 1 zeigt den Reaktionsablauf nach intravenöser Injektion von 45 mg Sympatol bei der Versuchsperson Hö. Wir sehen, daß es während der Initialphase bei dem vagoton eingestellten Ruhekreislauf zu einer Zunahme der Zirkulationsgrößen (Schlag- und Minutenvolumen) bei Absinken des peripheren Strömungswiderstandes kommt. Systolischer und diastolischer Blutdruck steigen an bei Zunahme der Blutdruckamplitude und Erhöhung des Mitteldruckes. Zum Zeitpunkt der maximalen Frequenzsteigerung sehen wir wie bei Adrenalin das schlagartige Auftreten von Verkürzungen der Anspannungs- und Austreibungszeit. Während die Austreibungszeit mit Normalisierung der Pulsfrequenz auf ihren Ausgangswert zurückgeht, bleibt die Anspannungszeit verkürzt. Die Pulsfrequenz unterschreitet während der pressorezeptorisch ausgelösten sekundären Bradykardie nicht den Ausgangswert.

Das gleichzeitige Auftreten des Frequenzmaximums und der Minimalwerte der Anspannungs- und Austreibungszeit legt die Vermutung nahe, daß die Verkürzungen der isotonischen und isometrischen Kontraktions-

phase vorwiegend durch die Zunahme der Herzschlagfolge bedingt sind. Die Abb. 2 zeigt jedoch, daß die Verkürzungen der Austreibungszeit nicht allein eine Folge der Frequenzsteigerung sind, da die Beziehungen der Diastolendauer, mechanischen Systolendauer und Austreibungszeit zur Pulsdauer bei einigen Meßpunkten im Sinne einer relativen Verkürzung der Austreibungszeit bei gleichzeitig relativer Verlängerung der Diastolendauer verschoben sind. Die relativen Verkürzungen der Austreibungszeit treten wie in den Adrenalinversuchen während des Frequenzrückganges (55—75 sec nach Injektionsbeginn) ein.

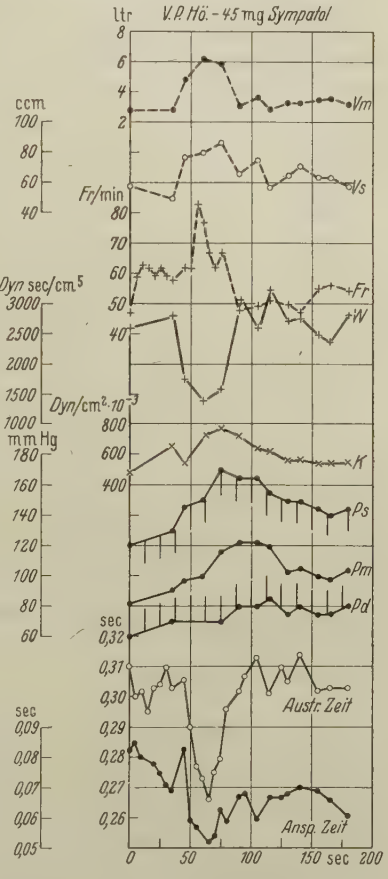


Abb. 1. Vp. Hö. i.v. Injektion von 45 mg Sympatol Injektionsdauer: 20 sec. *Vm* = Minutenvolumen; *Vs* = Schlagvolumen; *Fr* = Pulsfrequenz; *W* = Periph. Strömungswiderstand; *K* = Volumelastizitätsmodul; *Ps* = Systolischer Blutdruck; *Pd* = Diastolischer Blutdruck; *Pm* = Mitteldruck; *Austr. Z.* = Austreibungszeit; *Ansp. Z.* = Anspannungszeit. Zeit in Sekunden.

Eine Erklärung der Verkürzungen der Anspannungs- und Austreibungszeit als Folge der Umstellungen der physikalischen Kreislaufgrößen ist nur teilweise möglich. Wenn man zum Zeitpunkt der maximalen Frequenzsteigerung als Folge des gleichzeitig erhöhten Venendruckes eine vermehrte diastolische Füllung und somit vermehrte Anfangsspannung annehmen will, kann man hiermit die Verkürzung der Anspannungszeit erklären. Es erscheint uns jedoch wenig wahrscheinlich, daß der vermehrte venöse Zustrom zu einer Erhöhung des diastolischen Endvolumens führt, da die Erhöhung des Schlagvolumens bei der gleichzeitigen Frequenzsteigerung das vermehrte Angebot bewältigen dürfte. Es wäre darüber hinaus sogar denkbar, daß die Zunahme des Schlagvolumens durch eine Abnahme der physiologischen Restblutmenge ermöglicht wird. Am intakten Kreislauf sind jedoch die Füllungsänderungen des Herzens nach Injektion von Sympathikomimetika noch nicht ausreichend untersucht, um mit Sicherheit eine vermehrte diastolische Füllung ablehnen zu können.

Sarre und Herzig[5] glauben auf Grund der tierexperimentellen Ergebnisse von Gollwitzer-Meier und Kroetz[9], daß die dynamische Herzwirkung der Sympathikomimetika in einer Verkleinerung des systolischen Rückstandes und des diastolischen Volumens besteht. Sie nehmen somit an, daß das diastolische Volumen nach Sympathikomimetika eher kleiner wird, auf keinen Fall jedoch zunimmt. Somit glauben sie, daß die Zunahme der Gesamtenergie des Herzmuskels, die zu einer Verkürzung der Anspannungszeit führt, nicht durch eine vermehrte Anfangsfüllung und Anfangsspannung des Herzmuskels gewonnen wird, sondern, daß die Verkürzung der isometrischen Kontraktionsphase eine Folge der positiv inotropen Wirkung ist.

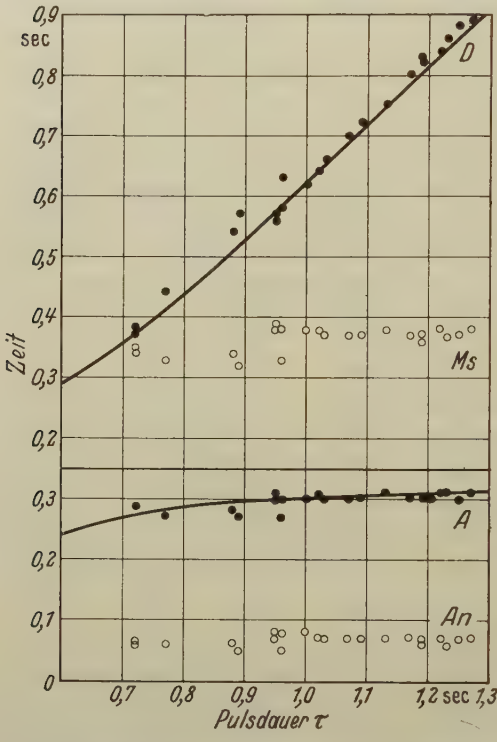


Abb. 2. Beziehungen der Diastolendauer zur Anspannungszeit, Austreibungszeit und mechanischen Systolendauer. Relative Verkürzungen der Austreibungszeit bei gleichzeitiger Verlängerung der Diastolendauer von der 55.—75. sec nach Injektionsbeginn. D = Diastolendauer; Ms = mechanische Systolendauer; A = Austreibungszeit; An = Anspannungszeit.

Wir möchten annehmen, daß der vermehrte venöse Rückstrom mit Sicherheit zu einer Zunahme des rechten Vorhofdruckes und somit des diastolischen Kammerdruckes im rechten Ventrikel führt. Im linken Ventrikel ist eine Zunahme der Druckdifferenz vom diastolischen Ventrikel- und Aortendruck anzunehmen. Selbst wenn wir auch einen Anstieg des diastolischen Ventrikeldruckes im linken Herzen annehmen wollen, dürfte dieser das Ausmaß der diastolischen Blutdrucksteigerung nicht ausgleichen können. Die Zunahme der Druckdifferenz zwischen Aorta und linkem Ventrikel müßte eine Verlängerung der Anspannungszeit bedingen. Das vergrößerte Schlagvolumen müßte ebenso eine verlängerte Austreibungszeit zur Folge haben. Wir möchten somit in diesem Versuch die Verkürzung der isometrischen und isotonischen Kontraktionsphase mit einer durch positive Inotropie bedingten Zunahme der Gesamtenergie des Herzmuskels erklären. Wir halten es darüber hinaus in unserem Versuch für denkbar, daß die Frequenzsteigerung bei dem vagotonen Kreislauf infolge wirksam werdender Relaxation zu einer Versteilerung

der Kurve der isotonischen Kontraktionsminima führt, die sich wiederum auf den zeitlichen Ablauf der Kontraktionsphasen des Herzmuskels verkürzend auswirken könnte.

Die Abb. 3 zeigt den mehrphasischen Reaktionsablauf der physikalischen Kreislaufgrößen nach 45 mg Sympatol. Nach 1 min, auf der Höhe des Blutdruckanstieges nach Ablauf der tachykarden Initialphase sehen wir eine geringe Zunahme des Schlagvolumens bei deutlich ausgeprägter sekundärer Bradykardie und somit vermindertem Minutenvolumen. Systolischer und diastolischer Blutdruck sowie der periphere Strömungswiderstand sind erhöht. Die Anspannungszeit wird verkürzt, während die Austreibungszeit etwas zunimmt. Im weiteren Verlauf sieht man bei fallendem Blutdruck — der diastolische Blutdruck sinkt unter die Norm — einen deutlichen Anstieg des Schlag- und Minutenvolumens bei sinkendem, bald den Ausgangswert unterschreitenden Strömungswiderstand.

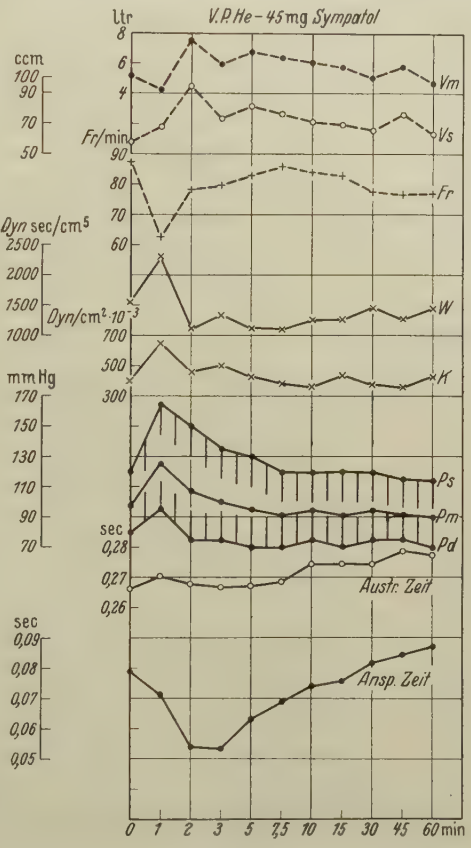


Abb. 3. Vp. He. i.v. Injektion von 45 mg Sympatol. *Vm* = Minutenvolumen; *Vs* = Schlagvolumen; *Fr* = Pulsfrequenz; *W* = Periph. Strömungswiderstand; *K* = Volumelastizitätsmodul; *Ps* = Systolischer Blutdruck; *Pd* = Diastolischer Blutdruck; *Pm* = Mitteldruck; *Austr. Z.* = Austreibungszeit; *Ansp. Z.* = Anspannungszeit. — Zeit in Minuten.

Unsere Ergebnisse entsprechen somit weitgehend denen von Böger, Deppe und Wezler[2], die während der Tachykardie eine Zunahme des Schlag- und Minutenvolumens bei gleichbleibendem elastischen und etwas vermindertem peripheren Strömungswiderstand finden. Mit Rückgang der Pulsfrequenz fanden sie eine Abnahme des Schlag- u. Minutenvolumens bei gleichzeitigem Anstieg des peripheren und elastischen Widerstandes. Im weiteren Verlauf (nach 5 min) tritt in ihren Versuchen eine erneute Zunahme der Zirkulationsgrößen ein (Schlag- und Minutenvolumenzunahme, Abnahme des peripheren und elastischen Widerstandes). In einem weiteren Beispiel zeigen Böger, Deppe und Wezler[2] das Ausbleiben der initialen Phase. Bei gleichbleibender Frequenz tritt eine Schlag- und Minuten-

volumenabnahme bei starker Erhöhung des peripheren Strömungswiderstandes und Zunahme des elastischen Widerstandes auf. Es konnten somit von ihnen einphasische und mehrphasische Reaktionsabläufe beobachtet werden. Nach i.m. Injektion von 120 mg Sympatol fanden Sarre und Herzig[5] eine Zunahme des Minutenvolumens bei Abnahme des peripheren Strömungswiderstandes.

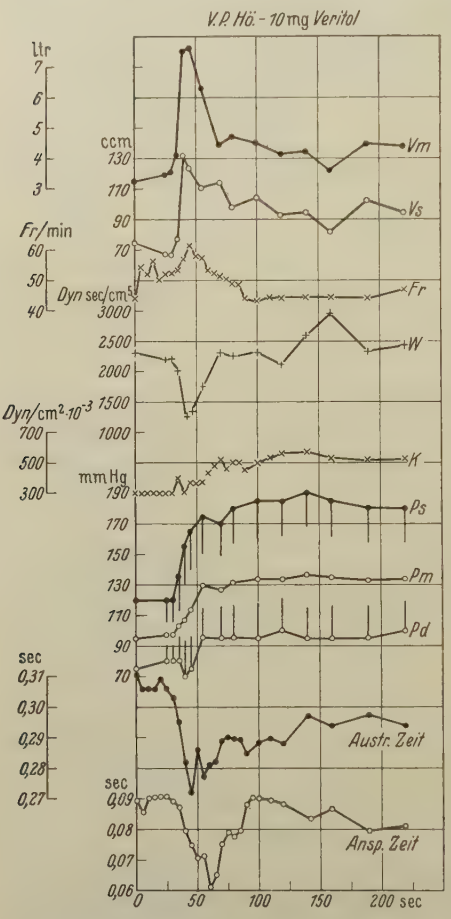


Abb. 4. Vp. Hö. i.v. Injektion von 10 mg Veritol. Injektionsdauer: 1—20 sec. *Vm* = Minutenvolumen; *Vs* = Schlagvolumen; *Fr.* = Pulsfrequenz; *W* = Periph. Strömungswiderstand; *K* = Volumelastizitätsmodul; *Ps* = Systolischer Blutdruck; *Pd* = Diastolischer Blutdruck; *Pm* = Mitteldruck; *Austr. Z.* = Austreibungszeit; *Ansp. Z.* = Anspannungszeit. — Zeit in Sekunden.

In unseren Versuchen konnten wir im Prinzip beim Sympatol den gleichen, dreiphasischen Ablauf wie beim Adrenalin feststellen. Quantitativ finden wir beim Adrenalin einen stärkeren Anstieg der Zirkulationsgrößen in der 1. und 3. Phase, während die dazwischen liegende Phase des Widerstandshochdruckes kürzer und weniger deutlich ausgeprägt ist. Die maximale Verkürzung der Anspannungszeit finden wir in der 2. und 3. min. Die Austreibungszeit nimmt im weiteren Verlauf etwas zu. Zur Deutung der Verkürzung der Anspannungszeit in diesem Versuch scheint die Annahme einer inotropen Wirkung des Sympatols nicht unbedingt notwendig, da gleichzeitig eine vermehrte diastolische Füllung wahrscheinlich ist (Bradykardie, vergrößertes Schlagvolumen). Die geringe Verlängerung der Austreibungszeit auf der Höhe des Blutdruckanstieges dürfte einmal eine Folge der Schlagvolumenzunahme und zum anderen der Ausdruck einer erschwerten Entleerung des Herzens sein. Die geringe Zunahme der Austreibungszeit im weiteren Verlauf kann als Folge des vermehrten Schlagvolumens aufgefaßt werden.

In 3 weiteren Versuchen konnten wir ebenfalls eine Verkürzung der Anspannungszeit bei wechselndem Verhalten der Austreibungszeit nachweisen. Da auch in diesen Versuchen während der Verkürzung der An-

spannungszeiten eine Bradykardie besteht und eine Zunahme des Schlagvolumens, kann eine vermehrte diastolische Füllung nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Ob die Verkürzung der Anspannungszeit neben der erhöhten Anfangsspannung durch eine positive Inotropie bedingt wird, läßt sich aus diesen Versuchen nicht entscheiden. Die jedoch auch

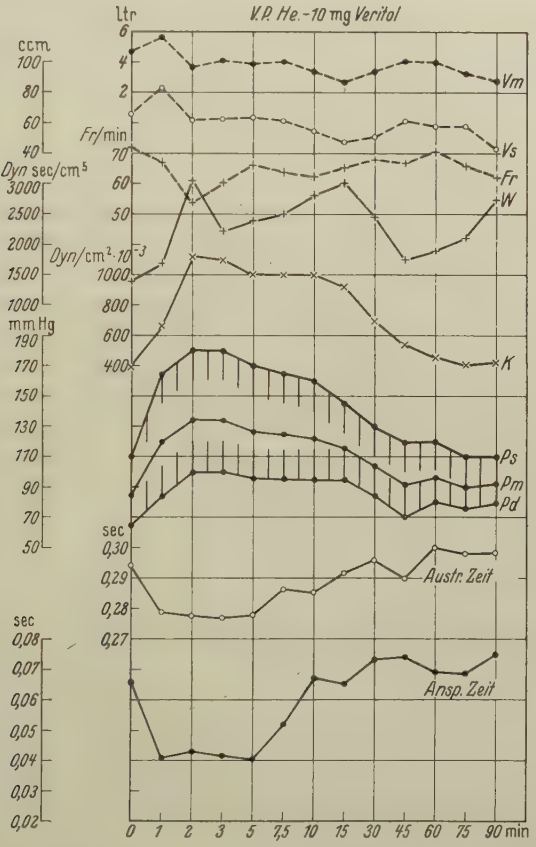


Abb. 5. Vp. He. i.v. Injektion von 10 mg Veritol, Injektionsdauer 20 sec. *Vm* = Minutenvolumen; *Vs* = Schlagvolumen; *Fr* = Pulsfrequenz; *W* = Periph. Strömungswiderstand; *K* = Volumelastizitätsmodul; *Ps* = Systolischer Blutdruck; *Pd* = Diastolischer Blutdruck; *Pm* = Mitteldruck; *Austr. Z.* = Austreibungszeit; *Ansp. Z.* = Anspannungszeit. — Zeit in Minuten.

nach Sympatol bei einem wechselnden Verhalten der physikalischen Kreislaufgrößen in allen Versuchen eintretende Verkürzung der Anspannungszeit bei unterschiedlichem Verhalten der Austreibungszeit macht eine inotrope Wirkung des Sympatols auch beim Menschen wahrscheinlich.

Die Änderungen der physikalischen Kreislaufgrößen und der Anspannungs- und Austreibungszeit nach Veritol zeigen die Abb. 4 u. 5.

Auch die Veränderungen der physikalischen Kreislaufgrößen nach Veritol zeigen im Prinzip mehrere Phasen, die denen bei Adrenalin und Sympatol entsprechen.

Auf die grundsätzliche Übereinstimmung des Kreislaufmechanismus nach Adrenalin, Sympatol und Veritol weisen auch Böger, Deppe und Wezler[2] hin. Die Veritolwirkung führt in ihren Versuchen besonders zu einer erheblichen Abnahme des Schlag- und Minutenvolumens bei gleichzeitigem Anstieg des peripheren Strömungswiderstandes und des elastischen Widerstandes. Ähnlich wie beim Sympatol stellen sie auch eine zweiphasische Wirkung fest (anfangs Tachykardie, Anstieg des Schlag- und Minutenvolumens bei gleichzeitigem Anstieg des elastischen Widerstandes und peripheren Strömungswiderstandes).

Während auf der Abb. 4 die initiale tachykarde Phase bei der vagotonen Ruheeinstellung des Kreislaufs besonders deutlich sichtbar wird, ist sie in dem Versuch, den Abb. 5 wiedergibt, nicht mehr erfaßt worden. In Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen sehen wir während der Initialphase zum Zeitpunkt des Frequenzmaximums erhebliche Verkürzungen der Anspannungs- und der Austreibungszeit. Gleichzeitig tritt eine Erhöhung des Schlag- und Minutenvolumens ein bei Senkung des peripheren Strömungswiderstandes. Systolischer und diastolischer Blutdruck steigen an. Zu diesem Zeitpunkt möchten wir eine positiv inotrope Wirkung des Veritols annehmen, da die Austreibungszeit bei erhöhtem Schlagvolumen verkürzt ist und gleichzeitig eine Verminderung der Druckdifferenz zwischen diastolischem Ventrikel- und Aortendruck unwahrscheinlich ist. Die Änderungen der isometrischen und isotonischen Kontraktionsphase, wie sie Abb. 5 wiedergibt, dürften vorwiegend durch vermehrte Ventrikelfüllung bedingt sein. Die Verkürzungen der Austreibungszeit und der Anspannungszeit nach 1 min lassen jedoch zusätzlich an eine positiv inotrope Wirkung denken.

In 3 weiteren Versuchen fanden wir, daß die Veritolwirkung vor allem zu einer Erhöhung des peripheren Strömungswiderstandes führt, bei geringer Abnahme des Schlag- und Minutenvolumens. Da in diesen Versuchen eine vermehrte diastolische Ventrikelfüllung infolge der Bradykardie nicht ausgeschlossen werden kann, kann die Verkürzung der Anspannungszeit, wie sie auch in diesen Versuchen beobachtet wird, nicht mit Sicherheit als Folge einer inotropen Wirkung angesehen werden. Die Austreibungszeit verhält sich in diesen Versuchen wechselnd, entsprechend dem Auswurfvolumen des Herzens.

Bei den Sympathikomimetika Adrenalin, Sympatol und Veritol können wir also im wesentlichen einen gleichartigen mehrphasischen Ablauf beobachten. Die Tendenz der Entstehung eines Minutenvolumenhochdruckes nimmt ab, während die Neigung der Entwicklung eines Widerstandshochdruckes zunimmt.

Betrachtet man vergleichend die Untersuchungen von Matthes[1], so kommt man zu der Feststellung, daß diese bezüglich der Hautdurchblutung gegenteilige

Ergebnisse aufweisen. MATTHES[1] sieht die stärkste Vasokonstriktion und Durchblutungsminderung unter Adrenalinwirkung, während er beim Veritol eine wesentlich geringere Abnahme der Hautdurchblutung — in einzelnen Versuchen sogar eine Mehrdurchblutung der Haut — feststellen konnte. MATTHES[1] schließt daraus, daß das Verhältnis der Durchblutung von Körperkern und Körperschale bei den einzelnen Sympathikomimetika verschieden sein muß. Während beim Adrenalin

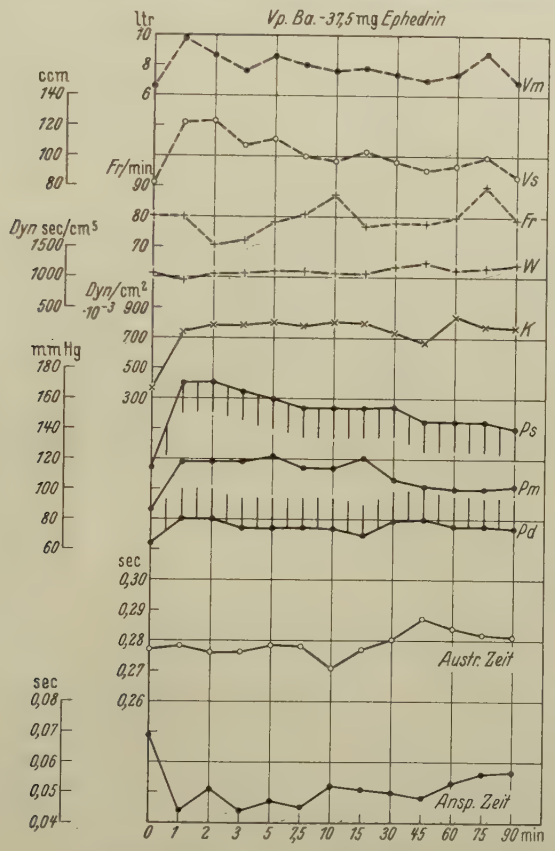


Abb. 6. Vp. Ba. i.v. Injektion von 37,5 mg Ephedrin, Injektionsdauer: 20 sec. *Vm* = Minutenvolumen *Vs* = Schlagvolumen; *Fr* = Pulsfrequenz; *W* = Periph. Strömungswiderstand; *K* = Volumelastizitätsmodul; *Ps* = Systolischer Blutdruck; *Pd* = Diastolischer Blutdruck; *Pm* = Mitteldruck; *Austr. Z.* = Austreibungszeit; *Ansp. Z.* = Anspannungszeit. — Zeit in Minuten.

bei gleichzeitiger Verminderung der Hautdurchblutung und Anstieg des Minutenvolumens eine vermehrte Zirkulation im Körperkern vermutet wird (Zentralisation des Kreislaufs), ist bei Veritol bei wenig verminderter Hautdurchblutung und gleichzeitig erniedrigtem Minutenvolumen eine Einschränkung der Zirkulation im Körperinnern anzunehmen.

Die Ephedrinwirkung zeigt die Abb. 6. Wir sehen eine Zunahme des Schlag- und Minutenvolumens bei gleichbleibendem peripheren

Strömungswiderstand. Mit dem Anstieg des systolischen und diastolischen Blutdruckes vergrößert sich die Blutdruckamplitude und der Mitteldruck steigt an. Nach 1 min tritt bei gleichbleibender Frequenz, unverändertem peripheren Strömungswiderstand, erhöhtem diastolischen Blutdruck und vergrößertem Schlagvolumen eine Verkürzung der Anspannungszeit auf. Da trotz gleichzeitig anzunehmender Venendrucksteigerung eine Zunahme der Druckdifferenz zwischen diastolischem Kammer- und Aortendruck wahrscheinlich ist und die Austreibungszeit bei erhöhtem Auswurfvolumen des Herzens nicht verlängert wird, nehmen wir einen über die möglicherweise vermehrte Anfangsspannung hinausgehenden Gesamtenergiegewinn des Herzmuskels im Sinne einer positiven Inotropie an. In anderen Versuchen konnten wir die von Böger, Deppe und Wezler[2] festgestellte Zunahme des peripheren Strömungswiderstandes und des elastischen Widerstandes gleichfalls beobachten (siehe Gatzek und Mechelke, Abb. 6[10]). In zwei weiteren Versuchen sahen wir nach Ephedrin eine Verkürzung der Anspannungszeit bei wenig veränderter Austreibungszeit. Unveränderte Zeiten der isometrischen und isotonischen Kontraktionsphase des Herzmuskels fanden wir in einem Versuch.

Unsere Untersuchungen zeigen, daß auch nach Ephedrin wie bei Adrenalin, Sympatol und Veritol prinzipiell der gleiche Phasenwechsel auftritt. Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Matthes[1], der besonders den zweiphasischen Ablauf nach Sympathikomimetika beim gesunden Menschen betont hat. Während der tachykarden Initialphase dürfte bei der Blutdepoteentleerung mehr oder weniger ausgeprägt eine Minutenvolumenzunahme eintreten bei gleichzeitiger Abnahme des peripheren Strömungswiderstandes (siehe Abb. 1 u. 4). Während der pressorezeptorisch ausgelösten bradykarden Vagusphase nimmt der periphere Widerstand zu bei Abnahme des Minutenvolumens. Im weiteren Verlauf tritt dann eine nochmalige Zunahme des Minutenvolumens auf. Wir möchten über die Gesamtenergiezunahme durch vermehrte Ruhedehnung auch beim Ephedrin an das Wirksamwerden einer positiven Inotropie denken.

Zusammenfassung.

Bei 5 herzgesunden Versuchspersonen wurden gleichzeitig die physikalischen Kreislaufgrößen und die Anspannungs- und Austreibungszeit nach intravenöser Injektion von 45 mg Sympatol, 10 mg Veritol und 37,5 mg Ephedrin bestimmt.

Die isometrische Kontraktionsphase des Herzmuskels wird nach den Sympathikomimetika verkürzt gefunden, während die isotonische Kontraktionsphase ein unterschiedliches Verhalten zeigt. Während der tachy-

karden Initialphase treten auch Verkürzungen der Austreibungszeit auf. Die Verkürzungen der Kontraktionsphasen des Herzmuskels sind nicht so ausgesprochen wie nach Adrenalin.

Diese Veränderungen können mit einer Gesamtenergiezunahme des Herzmuskels durch vermehrte Anfangsspannung allein nicht befriedigend erklärt werden, so daß eine zusätzliche positiv inotrope Wirkung der Sympathikomimetika angenommen wird.

Es wird bei Sympatol, Veritol und Ephedrin grundsätzlich der gleiche mehrphasische Ablauf der physikalischen Kreislaufgrößen wie nach Adrenalin festgestellt.

Literatur.

[1] Matthes, K.: Kreislaufuntersuchungen mit fortlaufend registrierenden Methoden am gesunden Menschen. Thieme-Verlag, Stuttgart, erscheint 1950. — [2] Böger, A., B. Deppe, u. K. Wezler: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **189**, 480 (1938). — [3] Blumberger, Kj.: Arch. Kreislaufforschg. **6**, 203 (1940). — [4] Pohle, F., u. H. Sarre: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **196**, 408 (1940). — [5] Sarre, H., u. W. Herzig: Klin. Wschr. **321** (1947). — [6] Mechelke, K., u. E. Nusser: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. im Druck. — [7] Broemser, Ph.: Verh. dtsch. Ges. Kreislaufforschg. **289** (1939). — [8] Mechelke, K., u. E. Nusser: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. im Druck. — [9] Gollwitzer-Meier, K. u. Chr. Kroetz: Klin. Wschr. **869** (1939). — [10] Gatzek, H., u. K. Mechelke: Zschr. Kreislaufforschg. **673** (1948).

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 328—335 (1950).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität (Leiter: Dr. F. Jung) und der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg (Direktor: Prof. E. Wollheim).

Über die Saponinhämolyse.

II. Mitteilung*.

Von

Fritz Jung und Lotteliese Wirth.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 19. Dezember 1949.)

Die verschieden große Saponinresistenz der Blutkörperchen verschiedener Tierarten (Rywosch[1]) hat sich bis heute noch nicht befriedigend erklären lassen. Da nun Rywosch, Kofler[2] u. a. bei ihren Versuchen stets von Blut oder Blutverdünnungen als Testmaterial ausgegangen sind und die wechselnden Zellkonzentrationen bei den verschiedenen

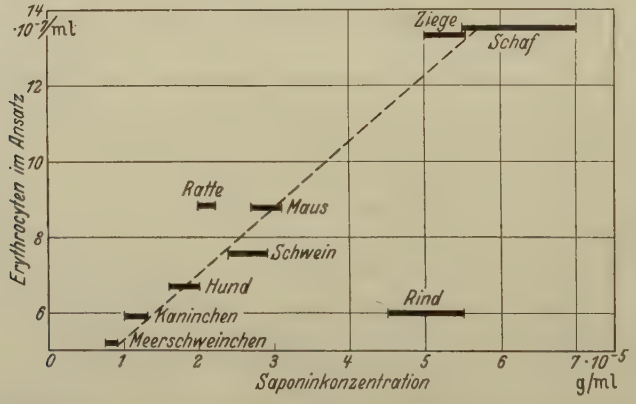


Abb. 1. Versuchsergebnisse von Rywosch, auf Zellkonzentration im Ansatz ausgewertet. Abscisse: Grenzkonzentration der Hämolyse (10^{-5} g Saponin/ml). Ordinate: Zellen im Ansatz (10^{-7} je ml).

Tierarten nicht berücksichtigt haben, glauben wir auf Grund der Versuche in der vorhergehenden Mitteilung eine einfache Deutung geben zu können: Die sogenannte Rywoschsche Resistenzreihe ist nur ein Ausdruck der verschieden großen *Zellzahlen* in den auf Saponinresistenz geprüften Blutproben bzw. Blutverdünnungen der einzelnen Tierarten. — Zur Überprüfung dieser Hypothese haben wir zunächst unter Ver-

* Vorhergehende Mitteilung: diese Z. **204**, 144 (1949).

wendung von Literaturdaten für die Zellzahl/cm³ bei den einzelnen Tierarten[3] und nach Umrechnung der Versuchsdaten von Rywosch in Abb. 1 die vermutliche Zellkonzentration im Ansatz gegen die hämolytische Grenzkonzentration des Saponins aufgetragen. Die Abbildung zeigt eine im allgemeinen eindeutige Korrelation zwischen beiden Größen auf. Da jedoch das Ergebnis für Rinderblut auffallend abweicht und außerdem die in Abb. 1 enthaltene Beziehung zwischen Saponinresistenz und Zellkonzentration in ihrem Verlauf quantitativ den Angaben unserer I. Mitteilung nicht entspricht, haben wir eigene Versuche durchgeführt. In diesem Zusammenhang überprüften wir ferner die von Schmidt-Thomé[4] vertretene Ansicht, die verschiedene Resistenz beruhe auf dem verschieden großen Cholesteringehalt der Zellen. Da auch unsere eigenen Versuche keine restlose Aufklärung der Rywoschschen Ergebnisse auf Grund der eingangs vertretenen Hypothese erlaubten, haben wir schließlich zur Deutung der Befunde noch Differenzen der Geschwindigkeit des Hämolyseablaufes bei den einzelnen Tierarten herangezogen.

Methodik.

a) Die Zellen der verschiedenen Tierarten wurden aus Zitratblut gewonnen und in der gerade gewünschten Konzentration in Tyrodelösung suspendiert. Die Zellzählungen wurden mit Hilfe der Bürkerschen Zählkammer vorgenommen. Um genaue Werte zu erhalten, wurden alle Verdünnungen mit geeichten Geräten hergestellt.

Die fertigen Suspensionen wurden dann mit Digitoninlösungen gemischt und 4 Std bei 40° (Wasserbad) gehalten. Der Hämolysegrad wurde durch Konzentrationsbestimmung des ausgetretenen Farbstoffs ermittelt. Für jede geprüfte Zellkonzentration wurde diejenige Digitoninkonzentration ermittelt, welche genau 50%ige Lyse herbeiführte. Sie ergab sich aus einer Verdünnungsreihe durch Interpolation. Durch umfangreiche Variation der Zellkonzentration wurden dann die in Abb. 2 wiedergegebenen Kurven erhalten. Mit Rücksicht auf das Übereinanderfallen der Kurven enthält die Abbildung allerdings nur einen Teil der Versuche. — Für jedes untersuchte Blut wurde nun weiter durch Interpolation im Netz der Abb. 2 diejenige Digitoninkonzentration ermittelt, bei welcher eine Suspension von 10^8 Zellen/ml gerade zu 50% hämolysiert. Diese Konzentrationen sind in Tab. 1 zusammengestellt und als Digitoninresistenz des betreffenden Blutes bezeichnet.

b) Der Cholesteringehalt der Blutkörperchen wurde nach dem von Schmidt-Thomé entwickelten Verfahren[4] bestimmt. Es ist mit menschlichem Blut bequem und genau, macht aber bei anderen Blutsorten (z. B. Schaf und Rind) Schwierigkeiten. In solchen Fällen wurde zunächst der standardisierten Digitoninlösung eine bekannte, zur Sättigung sicher nicht ausreichende Zellmenge der zu untersuchenden Blutart zugegeben, einige Stunden bei 40° gehalten, und dann zu Ende unter Verwendung menschlicher Zellen bekannten Titers titriert.

Sämtliche in dieser Mitteilung wiedergegebenen Digitoninkonzentrationen sind nach Schmidt-Thomé[4] gegen eingewogenes Cholesterin titriert. Die Werte liegen etwas unter der Einwaage (etwa 14,6 statt 15 mg), doch so wenig, daß dadurch die Ergebnisse der vorhergehenden Mitteilung nicht berührt werden.

c) Der Hämolyseverlauf wurde entsprechend dem Vorgehen Wilbrandts[5] über eine Photozelle photographisch registriert. Zunächst befand sich die Digitoninlösung im Strahlengang, zu ihr wurde mittels einer federgetriebenen Injektionsspritze die Zellsuspension gegeben. Alle Messungen wurden bei rotem Licht (Schottfilter RG 2) durchgeführt. — Die Auswertung der Kurven ergab ein überraschendes Ergebnis, auf dessen Deutung hier nicht eingegangen werden soll. Wir haben uns daher in Abb. 4 auf Wiedergabe der Latenzzeit der Hämolyse beschränkt. Wir halten diese für ein gutes Maß der Gesamtgeschwindigkeit der Umsetzung zwischen Digitonin und Blutzellen.

1. Hämolysegrad und Saponinkonzentration.

Abb. 2 zeigt, daß die Beziehung zwischen Hämolysegrad, Zell- und Digitoninkonzentration für alle von uns untersuchten Tierarten praktisch identisch ist. In dem bequem zugänglichen mittleren Konzentrationsbereich (zwischen 10^8 und 10^9 Zellen/ml) trifft die von uns früher festgestellte quadratische Beziehung zwischen Digitonin- und Zellkonzentration zu. Der parallele Verlauf der Einzelkurven rechtfertigt die zur Gewinnung von Tab. 1 vorgenommene Interpolation. Aus der Tabelle geht hervor, daß nach Elimination des Einflusses der Zellzahl keine deutlichen Artunterschiede mehr ablesbar sind, sie werden praktisch von der individuellen Variation überdeckt. Die quantitativen Unterschiede zwischen den Einzelbefunden sind relativ gering. Mittelt man für die einzelnen Arten, so übersteigen sie den Faktor 2 nicht. Bei Rywosch beträgt der Faktor bis zu 7. — Dieses Ergebnis bestätigt somit unsere eingangs geäußerte Ansicht, hinter der Rywoschschen Reihe verberge sich die verschiedene Zellkonzentration im Blut der einzelnen Tiere.

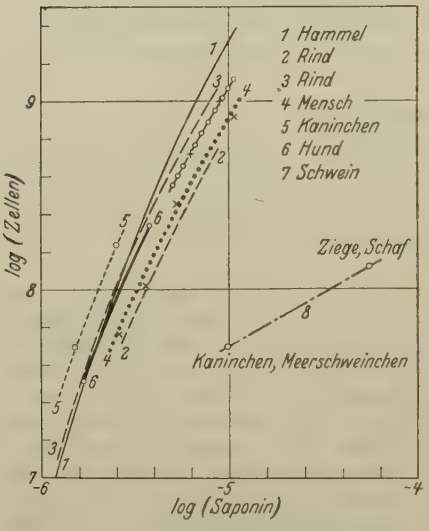


Abb. 2. Digitoninresistenz und Zellkonzentration. Abszisse: Logarithmus der Digitoninkonzentration (in g/ml). Ordinate: Logarithmus der Zellkonzentration (Zellen je ml). Die Meßpunkte geben Werte für 50% Hämolyse, nicht für Hämolysebeginn. Versuch 4 ist der vorhergehenden Mitteilung entnommen. Kurve 8 entspricht etwa Abb. 1, sie wurde zum Vergleich beigegeben.

Die von Rywosch herausgestellte Gegenläufigkeit zwischen osmotischer Resistenz und Saponinresistenz wird ebenfalls verständlich. Große Zellzahlen je Volumeinheit Blut entsprechen nämlich kleinen Zellen und umgekehrt. Ponder führt aber bereits aus[3], daß die osmotische Resistenz

kleiner Zellen — aus rein äußeren Gründen, wie etwa der Zellform — geringer ist als diejenige großer Zellen. Tierblut mit vielen und kleinen Zellen besitzt somit eine hohe Saponin- und geringe osmotische Resistenz. Tierblut mit wenigen und großen Zellen verhält sich umgekehrt. Doch können diese Verhältnisse nur deutlich werden, wenn Blut von Tierarten mit großen Differenzen verglichen wird, da sonst die individuelle Variation der Resistenz die Beziehung verwischt.

Tabelle 1. *Digitoninresistenz und Digitoninbindungsvermögen.*

Die Resistenz wird als diejenige Digitoninkonzentration angegeben, bei welcher eine Zellaufschwemmung mit 10^8 Zellen/ml in 4 Std und bei 40° gerade zu 50% hämolysiert. Das Digitoninbindungsvermögen wird — entsprechend dem Vorgehen Schmidt-Thomés — als Cholesterin in mg/Zelle angegeben.

Blutart	Digitoninresistenz (log [Digitonin in g/ml])	Cholesterin (in 10^{-13} mg/Zelle).	Mittelwerte
Schaf	0,22 — 6	0,71	
„	0,50 — 6	0,78	0,75
„	0,40 — 6	—	
Ziege	0,60 — 6	0,46	
Ratte	0,40 — 6	1,22	
Schwein	0,50 — 6	1,08	
Katze	0,36 — 6	1,14	
Hund	0,40 — 6	1,40	
„	0,40 — 6	1,48	1,45
Rind	0,48 — 6	1,22	
„	0,46 — 6	1,05	
„	0,36 — 6	1,17	1,15
„	0,55 — 6	1,06	
„	0,40 — 6	1,27	
Kaninchen	0,32 — 6	1,17	
„	0,31 — 6	0,98	1,13
„	0,28 — 6	1,24	
Mensch	0,42 — 6	1,70	
„	0,48 — 6	1,60	
„	0,46 — 6	1,60	1,65
„	0,70 — 6	1,70	
„	0,51 — 6	—	

2. Digitoninbindungsvermögen und Digitoninresistenz.

Tab. 1 enthält neben der Digitoninresistenz auch das Digitoninbindungsvermögen der Zellen. Zwischen beiden Werten besteht keine deutliche Beziehung: Weder Menschen- und Hundeblut mit ihren hohen, noch Ziegen- und Schafblut mit ihren geringen Bindungswerten zeigen ein auffallendes Verhalten im Resistenzversuch. Kaninchenzellen mit ihrer relativ geringen Resistenz zeigen andererseits ein durchschnittliches Bindungsvermögen.

Bindungsvermögen und Zellgröße bzw. besser Zelloberfläche stehen dagegen zueinander in einer ganz eindeutigen Korrelation: Abb. 3. Die seitherigen Literaturdaten lassen eine solche nicht sicher erkennen, da sie von verschiedenen Autoren mit verschiedenen Methoden gewonnen wurden. Das Ergebnis ist leicht verständlich: Cholesterin ist ein wichtiger Membranbestandteil und sollte daher bei ähnlicher Zusammensetzung der Zellen verschiedener Tierarten oberflächenproportional enthalten sein. Die in Abb. 3 ausgezogene Linie ist eine quadratische Funktion des Durchmessers (Cholesterin [in 10^{-13} mg/Zelle] $= 0{,}028\ d^2$ [Durchmesser d in μ]) und demonstriert daher diese Oberflächenproportionalität.

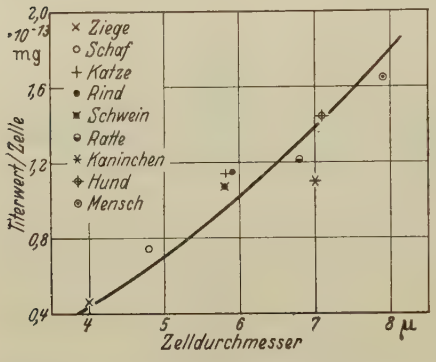


Abb. 3. Digitonintiter (Cholesteringehalt) und Zellgröße. Abszisse: Zelldurchmesser in μ. Ordinate: Digitonintiter in 10^{-13} mg Cholesterin/Zelle.

Diese Beziehung zwischen Zelloberfläche bzw. Zellgröße und Cholesteringehalt bringt eine sekundäre Beziehung zwischen Cholesteringehalt einer Blutprobe und deren Digitoninresistenz mit sich. Tiere mit vielen kleinen Blutkörperchen besitzen in einer Blutverdünnung bestimmter Farbstoffkonzentration wesentlich mehr Cholesterin an den Zellen als Tiere mit wenigen großen Blutkörperchen. Wegen der höheren Zellkonzentration ist aber auch die Digitoninresistenz größer. Cholesteringehalt einer Blutprobe und Saponinresistenz müssen daher parallel gehen.

3. Hämolysegeschwindigkeit bei Zellen verschiedener Tierarten.

Überraschenderweise erhielten wir bei unseren Digitoninversuchen einen grundsätzlich andersartigen Verlauf der Hämolyse, als WILBRANDT[3] und auch schon PONDER[3] mit Saponin (Saponinum album) beobachtet haben. Nach Mischen der Digitoninlösung mit der Zellsuspension zeigen die Erythrozyten eine bestimmte wohldefinierte Zeitspanne praktisch gar keine Veränderung, um dann ziemlich plötzlich (nach Ablauf der „Latenzzeit") zu hämolysieren. PONDER[3] wie WILBRANDT haben dagegen einen mehr kontinuierlichen Prozeß beobachtet. Wir möchten heute deren Ergebnis der Verwendung eines sehr uneinheitlichen Saponins zuschreiben, bei welchem sich zahlreiche Einzelreaktionen mit verschiedener Latenzzeit überlagern. — Die Latenzzeit kann als Maß für die Hämolysegeschwindigkeit verwandt werden. Sie ist von der Digitonin- wie Zellkonzentration in recht komplizierter Weise abhängig, doch strebt sie mit abnehmender Zellkonzentration einem Grenzwert zu. Der Logarithmus dieses Grenzwertes ist in einem relativ großen Konzentrationsbereich dem Logarithmus der Digitoninkonzentration propor-

tional. Der Proportionalitätsfaktor liegt zudem nahe bei 1, d. h. Latenzzeit und Digitoninkonzentration sind sich annähernd direkt proportional (Jung und Schwartzkopff, unveröff.). Wir haben nun in Tab. 2 diese Latenzzeit L für die Grenzbedingung „sehr geringe Zellkonzentration" und eine Digitoninkonzentration von 10^{-5} g/ml aus einer größeren Versuchsreihe zusammengestellt. Außerdem enthält die Tabelle den Proportionalitätsfaktor $d \log L / d \log$ [Digitonin] (L in Sekunden, Digitonin

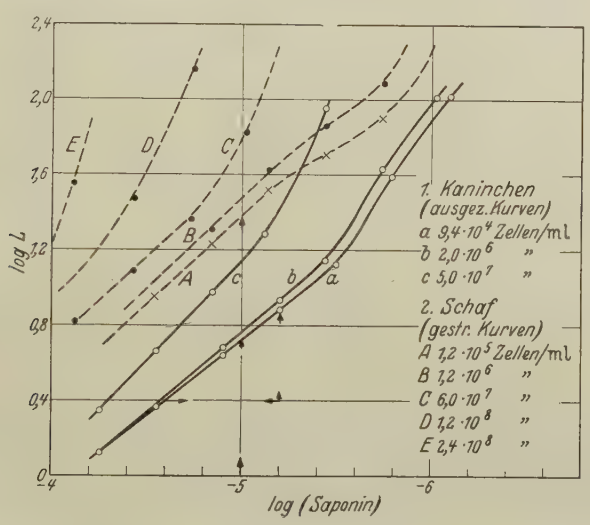


Abb. 4. Latenzzeit der Digitoninhämolyse in Abhängigkeit von der Zell- und Digitoninkonzentration
Abszisse: Logarithmus der Digitoninkonzentration (g/ml).
Ordinate: Logarithmus der Latenzzeit L (sec).

in g/ml). Abb. 4 zeigt je eine Versuchsreihe für Schaf- und Kaninchenblut. Jedem der Werte in Tab. 2 liegt eine derartige Versuchsreihe zugrunde. Aus der Abbildung läßt sich die Gewinnung der Werte L und $d \log L / d \log$ [Digit] leicht entnehmen.

Die Latenzzeit bzw. Hämolysegeschwindigkeit ist bei den untersuchten Tierarten außerordentlich verschieden, die Blutkörperchen des Schafes hämolysieren etwa 5 mal langsamer als die des Kaninchens. Es läßt sich somit, entsprechend der Ordnung in der Tabelle, eine neue Hämolysereihe aufstellen, welche jedoch der alten Rywoschschen Reihe nicht entspricht und deren Ordnung sich weder mit der Zellgröße noch mit dem Cholesteringehalt der Zellen in Zusammenhang bringen läßt. Eine Ausnahme stellt das Kaninchenblut dar, welches im Verhältnis zu seiner Zellgröße einen sehr geringen Cholesteringehalt besitzt (vgl. Abb. 3). eine relativ geringe Resistenz zeigt, Tab. 1, und besonders schnell hämolysiert, Tab. 2.

Tabelle 2. *Hämolysegeschwindigkeit.*

L ist diejenige Zeit, nach welcher die Lyse einer sehr verdünnten Zellsuspension in einer Digitoninlösung von 10^{-5} g/ml einsetzt.

Blutart	Latenzzeit L (in sec)		$\frac{d \log L}{d \log (\text{Digitonin})}$
	1. $\log L$	2. L	
Schaf	1,40	25	1
„	1,36	23	0,9
Rind	1,03	10,7	—
„	1,06	11,5	0,76
„	1,08	12	0,76
Katze	0,9	8	0,78
Ratte	0,87	7,4	0,84
Schwein	0,82	6,6	1
„	0,88	7,6	0,95
Mensch	0,8	6,4	0,78
„	0,8	6,4	0,8
„	0,83	6,7	—
Hund	0,73	5,4	—
„	0,70	5,0	0,82
Kaninchen	0,8	6,4	0,83
„	0,74	5,6	0,83
„	0,70	5,0	—

Die Abweichung des Differentialquotienten in Spalte 3 von 1 ist schwierig zu erklären. Möglicherweise handelt es sich um ein statistisches, durch die Inhomogenität des Reaktionssystems bedingtes, Phänomen.

4. Diskussion.

1. Unsere Versuche erlauben eine Erklärung des Zustandekommens der ursprünglichen Rywoschschen Reihe. Der wichtigste Variationsfaktor ist die wechselnde Blutkörperchenzahl in den Versuchsreihen Rywoschs wie seiner Nachuntersucher. Leider läßt sich diese bei einer Nachuntersuchung nicht genau reproduzieren. Ohne Zweifel kommt aber noch als zweiter Faktor die verschieden große Hämolysegeschwindigkeit hinzu. Jene tritt um so mehr in den Vordergrund, je konzentrierter die Zellsuspensionen sind, je mehr Digitonin also bei der Lyse verbraucht wird. Auch bei zunehmender Digitoninverdünnung wird er wirksamer. (Die Kurven auf Abb. 4 fächern nämlich mit zunehmender Zell- und abnehmender Digitoninkonzentration — nach rechts oben — auf.) Bei der Rywoschschen Versuchsanordnung, aber auch bei Ponder und Kofler, tritt er daher ausgesprochen in Erscheinung: in Abb. 1 liegen die Werte für die Tiere mit langsam hämolysierenden Zellen viel zu weit rechts.

2. Der Cholesteringehalt der Einzelblutzelle ist ohne Einfluß auf deren Digitoninresistenz. Aus diesem Grund sind etwa die Ergebnisse von F. Rosenthal und F. Patrzek[6] — im Gegensatz zur Meinung Schmidt-Thomés — in sich gut verträglich: Abfall des Zellcholesterins bei schwer

hungernden Menschen unter gleichzeitiger Erhaltung der Saponinresistenz. Für die Lyse einer Zelle braucht eben nur ein Bruchteil des Cholesterins mit dem Digitonin zu reagieren.

Zusammenfassung.

1. Es werden Daten über die Digitoninresistenz, das Digitoninbindungsvermögen bzw. den Cholesteringehalt und die Geschwindigkeit der Digitoninhämolyse für eine Reihe von Tierarten mitgeteilt.

2. Die von Rywosch entdeckten Resistenzreihen der Blutkörperchen verschiedener Tierarten gegenüber Saponin kommen in erster Linie durch die wechselnde Zellzahl in volumgleichen Blutproben zustande.

3. Die Geschwindigkeit der Digitoninhämolyse zeigt bei den verschiedenen Tierarten sehr große Differenzen. In der von Rywosch angewandten Versuchsanordnung dürften Geschwindigkeitsdifferenzen in die erhaltenen Ergebnisse eingehen.

4. Die roten Blutkörperchen enthalten ihr Cholesterin in einer der Zelloberfläche proportionalen Menge. Die Cholesterinmenge je Zelle ist ohne Einfluß auf deren Digitoninresistenz.

Literatur.

[1] Rywosch, D.: Pflügers Arch. **116**, 229 (1907). — [2] Kofler, L.: Die Saponine, Springer, Wien 1927. — [3] Ponder, E.: Hemolysis and Related Phenomena, Grune & Stratton, New York 1948. — [4] Schmidt-Thomé, J.: Z. physiol. Chemie **275**, 183 (1942). — [5] Wilbrandt, W.: Pflügers Arch. **245**, 22 (1942). — [6] Rosenthal, F., u. F. Patrzek: Dtsch. Med. Wschr. **5**, 571 (1919).

Fritz Jung, Berlin-Buch, Institut für Medizin u. Biologie.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 336—345 (1950).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.

Cholerese durch synthetische Mittel.

4. Mitteilung.

Die narkotisierte Ratte als poikilothermes Studienobjekt.

Von

WERNER KALOW.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 30. August 1949.)

Beim Studium der Rattencholerese[1, 2, 3] fiel die starke Abhängigkeit der Gallensekretion von der Körpertemperatur auf. Darum wurde zunächst der Grad der Temperaturabhängigkeit gemessen. Dann stellte sich heraus, daß die Wirkungskurven von Decholin und Phenylmethylkarbinol zwar bei normaler Körpertemperatur von ähnlicher Form waren, daß sie sich bei unterkühlten Ratten aber deutlich unterschieden.

Neben den speziellen Fragen für die Wirkungsweise der Choleretica, die sich aus diesen Experimenten ergaben, wurden damit auch allgemeinere Probleme berührt. Denn 1. gehört die Untersuchung von Temperatureinflüssen auf pharmakologische Wirkungen überhaupt noch zu einem knapp bearbeiteten Kapitel; 2. erschien mir die narkotisierte Ratte als ein zum Studium der Temperaturabhängigkeit biologischer Reaktionen brauchbares Objekt, das bisher wenig benutzt wurde; 3. ergaben sich Beobachtungen über die Wärmeverteilung im Organismus eines künstlich beheizten Versuchstieres.

Methodik.

1. Operative Methodik.

Die Rattengalle wurde in der gleichen Weise wie früher[1] gewonnen. Sämtliche Choleretica wurden in physiologischer Kochsalzlösung in eine freigelegte Oberschenkelvene injiziert.

2. Messung der Gallensekretion.

Zur Registrierung diente entweder ein Ordinatenschreiber, oder die für die Bildung eines Galletropfens notwendige Zeit wurde direkt mit der Stoppuhr gemessen. Der reziproke Wert dieser Zeit diente als Maß für die jeweilige Sekretionsgeschwindigkeit. Die Tropfenfolge war regelmäßig genug, um auf diese Weise brauchbare Wirkungskurven zu erzielen. Da es sich stets um die Messung von Änderungen der Sekretionsgeschwindigkeit handelte, habe ich auf die Bestimmung absoluter Werte in Raum- oder Gewichtseinheiten verzichtet. Da nicht bei allen Ratten die gleiche Glaskapillare verwendet werden konnte, dürfte das Gewicht eines Galletropfens bei verschiedenen Tieren ungleich gewesen sein. Deshalb sind zwischen den

Individuen jeweils nur die Sekretionsänderungen in prozentualen Werten vergleichbar.

3. Die Regulation der Körpertemperatur.

Nach intraperitonealer Injektion von 1 g/kg Urethan kühlte die Ratte sehr rasch so weit ab, daß ihre Körpertemperatur nur wenige Grad oberhalb der Zimmertemperatur lag. Durch einen geheizten Operationstisch ließ sich die Körpertemperatur regeln und mit einiger Übung auf gewünschte Werte einstellen. Die Rektaltemperatur folgte in Minuten jeder Änderung der Unterlagentemperatur. Die Erwärmung erfolgte durch eine elektrische Heizplatte, deren Stromzufuhr mit Hilfe eines Schiebewiderstandes und eines Amperemeters geregelt wurde. Während der Wirkungsdauer eines Choleretikums wurde die eingestellte Lebertemperatur konstant gehalten. Beim Übergang von niedrigen zu hohen Temperaturen wurden einige Tiere zusätzlich von oben her durch eine gewöhnliche Glühlampe erwärmt. Bei einer Gruppe von Ratten wurde die Cholerese erst am kalten Tier geprüft und dann der gleiche Versuch nach Erwärmung wiederholt, bei der anderen Gruppe war die Reihenfolge umgekehrt.

4. Die Messung der Körpertemperatur.

Ein großer Wasserthermostat, dessen Schwankungen $\pm$ 0,04° C betrugen, enthielt eine Lötstelle von 3 Thermoelementen. Die anderen Lötstellen waren in Kanülen befestigt und mit einem Hg-Thermometer geeicht. Dabei waren ihre Temperaturen mit dem gleichen Galvanometer durch Umschaltung nacheinander auf 1/10° C genau abgelesen worden. Im Versuch wurden die außerhalb der Tierkörper befindlichen Teile der Kanülen zur Wärmeisolation mit Watte umwickelt und mit Mull abgedeckt. Auf diese Weise wurde bestimmt:

a) Die Rektaltemperatur 1½ cm oberhalb des Anus.

b) Die Lebertemperatur. Nach Anlegung der Gallenfistel wurde die Lötstelle zwischen die größten Leberlappen gelegt und danach der Bauchraum soweit wie möglich zugenäht. In 2 Fällen wurde ein Leberlappen durch die Atembewegungen oberflächlich verletzt. Diese Verletzung hatte weder einen erkennbaren Einfluß auf Cholerese und Lebertemperatur noch kam es zu bemerkenswerten Blutungen.

c) Die Muskeltemperatur der rechten Oberschenkelstrecker, in deren Muskulatur die Kanüle mit dem Thermoelement eingestochen wurden.

Ergebnisse.

1. Die Temperaturabhängigkeit der Gallensekretion.

Ein typisches Beispiel für die Abhängigkeit der Gallensekretion von der Lebertemperatur zeigt Abb. 1. Mit abnehmender Temperatur fällt die Sekretionsgeschwindigkeit und steigt mit zunehmender Erwärmung wieder an. Im Bereich der normalen Lebertemperatur ist die Cholerese am stärksten. Bei weiterer Temperatursteigerung kommt es wieder zu einer Abnahme der Sekretionsgeschwindigkeit als Ausdruck der zunehmenden Schädigung des Tieres bis zum Tode. Diese Schädigung beginnt hier bei einer Lebertemperatur von 40° C, was die Empfindlichkeit von Ratten gegen Erwärmung erweist. Der Kältetod tritt erst bei einer Rektaltemperatur von $< 15°$ ein[4].

Der Temperaturquotient der Gallensekretion ist im vorliegenden Versuch bei steigender und fallender Temperatur etwa gleich. Dennoch decken sich die beiden entsprechenden Kurventeile nicht völlig.

Die Rechnung mit der Sekretionsgeschwindigkeit und ihrer Abhängigkeit von der Temperatur ist anschaulicher als die aus physikalisch-chemischen Gründen korrektere Rechnung mit dem Logarithmus der Sekretionsgeschwindigkeit und dem reziproken Wert der absoluten Temperatur. In Abb. 1a und b sind die Ergebnisse des gleichen Versuchs in verschiedener Darstellungsweise nebeneinander gestellt. Die Kurven sind nicht wesentlich verschieden, und die Genauigkeit der Versuchswerte ist nicht so groß, daß die einzelnen Punkte bei der exakteren Darstellungsmethode eine glattere Kurve ergäben. Darum sei im folgenden die Operation mit den anschaulicheren Begriffen beibehalten. Aus demselben Grunde ist auch die Verwendung des Temperaturquotienten Q_{10} gerechtfertigt.

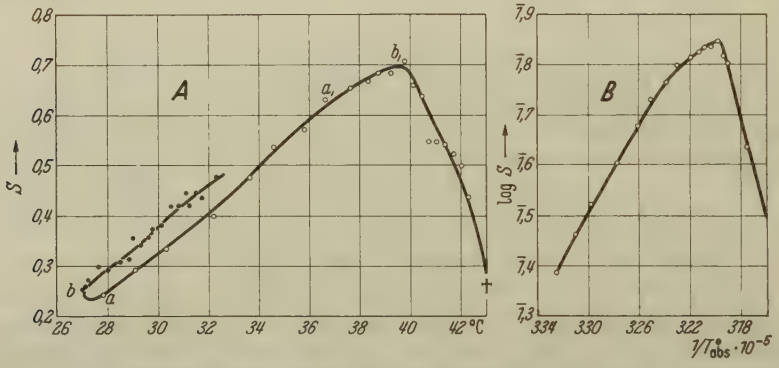


Abb. 1. A. Abhängigkeit der Gallensekretion von der Lebertemperatur (Ratte ♂ 200 g, Urethan 1 g/kg i. p.). Abszisse: Temperatur in ° C. Ordinate: Sekretionsgeschwindigkeit als reziproker Wert der Tropfenzeit in min. Volle Punkte bei fallender, leere Kreise bei steigender Temperatur. B. Teil des gleichen Versuchs wie A. Abszisse: Reziproker Wert der absoluten Temperatur × 10^{-5}. Ordinate: Logarithmus der Sekretionsgeschwindigkeit.

Mit welcher Genauigkeit läßt sich nun Q_{10} aus den vorliegenden Ergebnissen für die Gallensekretion der Ratte festlegen? Wenn man für die Berechnung die Punkte a—a' in Abb. 1 verwendet, erhält man den Wert $Q_{10} = 2{,}97$. Legt man die Punkte b—b' der Rechnung zugrunde, ergibt sich $Q_{10} = 2{,}22$*. Bei der Auswertung analog zu b—b' von 10 weiteren Versuchen, die im übrigen der Prüfung choleretischer Mittel dienten, ergab sich ein Durchschnittswert $Q_{10} = 2{,}15$ mit einer individuellen Schwankungsbreite zwischen 1,54 und 3,25. Die Zeit für die Temperaturveränderung betrug 1—2½ Std. Bei den Versuchen mit sehr langsamer Änderung der Lebertemperatur und bei fallender Temperatur lagen die Werte für den Quotienten etwas über dem Mittel.

* Die Berechnung erfolgte nach $\log Q_{10} = \frac{10}{t_2 - t_1} \log \frac{k_2}{k_1}$, wobei t die Temperatur in ° C, k die Gallensekretionsgeschwindigkeit ist (HITCHCOCK[5]).

Die Gallensekretion wurde hier zur Lebertemperatur in Beziehung gesetzt, weil die Differenz zwischen Rektaltemperatur und Lebertemperatur nicht konstant war. Stets blieb die Lebertemperatur aber höher, solange das Tier lebte, meist um 2—3° C. Erst im Sterben glichen sich die Temperaturdifferenzen aus. Ferner bestand bei der durch Narkose poikilothermen Ratte eine stärkere Tendenz, die Lebertemperatur konstant zu halten als die Rektaltemperatur. Das zeigte sich in einer Vergrößerung der Temperaturdifferenz bei Abkühlung, einer Verkleinerung bei Erwärmung des Tieres.

Wieweit sich in diesem Verhalten einfache physikalische Vorgänge spiegeln und wieweit aktive Reaktionsmechanismen dabei beteiligt waren, sei dahingestellt. Bei 13 Versuchen betrug die maximale Temperaturdifferenz im Mittel 3,4°, die minimale 2,3°. Die höchste überhaupt beobachtete Differenz war 4°, die geringste 0,5°. Außerdem gab es von vornherein individuelle Unterschiede für die Differenzwerte; so blieb die Differenz bei einem Versuch (Nr. 5) stundenlang etwa 1,6°, bei einem anderen (Nr. 9) etwa 3°.

Die Temperatur der Oberschenkelmuskulatur lag gewöhnlich etwa 0,3° unter der Rektaltemperatur. Die Relation zwischen diesen beiden Temperaturen war unabhängig von der Differenz zwischen Leber- und Rektaltemperatur.

2. Die Wirkung von choleretischen Mitteln bei verschiedener Temperatur.

Da die Gallensekretion einer Ratte ohne Schwierigkeiten über 6 Std verfolgt werden konnte, war es möglich, die Wirkung eines Choleretikums am gleichen Tier bei hoher und niedriger Lebertemperatur zu prüfen.

Unter hoher Lebertemperatur soll hier der Bereich zwischen 35—37,5° C verstanden werden. Bei Ratten von normalen Temperaturen zu sprechen, erfordert besondere Definitionen[6]. Die niedrige Lebertemperatur lag hier stets um 26° C.

Bei einem Teil der Tiere erfolgte die Applikation des Medikaments zuerst bei niederer, bei dem anderen Teil zuerst bei hoher Temperatur. Geprüft wurde vor allem dehydrocholsaures Natrium (Decholin) und der Bernsteinsäureester des Phenylmethylkarbinols als Natriumsalz (PMCB), daneben auch cholsaures Natrium und Tolylmethylkarbinol in der gleichen Esterbindung wie sein Homologes (TMCB).

An Hand von 2 typischen Kurven seien zunächst die Ergebnisse im Prinzip geschildert (Abb. 2 und 3). Der Effekt von Decholin ist bei hoher Temperatur viel größer als bei unterkühlter Leber; dabei sind die Formen der beiden Wirkungskurven nicht sehr verschieden. Das PMCB wirkt bei hoher Temperatur auf die Tropfenzahl ähnlich wie das Decholin, wenn auch schwächer. Wäre nach Mol dosiert worden und nicht nach Milligramm, würde der stärkere Effekt des Decholins noch mehr zum Ausdruck kommen. Jedoch ist diese Frage hier nicht wichtig, da sich diese beiden Heilmittel in der Wirkung auf die Gallequalität unterscheiden.

Auffällig ist aber, daß der Effekt vom PMCB bei niedriger Temperatur zeitlich stark verzögert eintritt. Die Cholsäure ist in der gleichen Weise

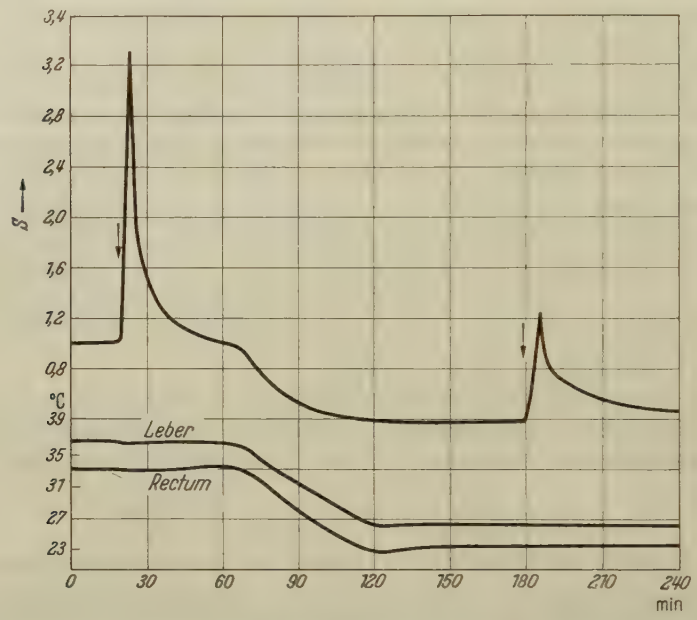


Abb. 2. Wirkung von Natriumdehydrocholat (Decholin) 15 mg/kg i. v. (Ratte ♀ 220 g, Urethan 1g/kg i. p.). Abszisse: Zeit in min. Ordinate: Sekretionsgeschwindigkeit (vgl. Abb. 1) bzw. Temperatur in ° C. Obere Kurve: Cholerese. Mittlere Kurve: Lebertemperatur. Untere Kurve: Rektaltemperatur. Pfeile: Injektionen.

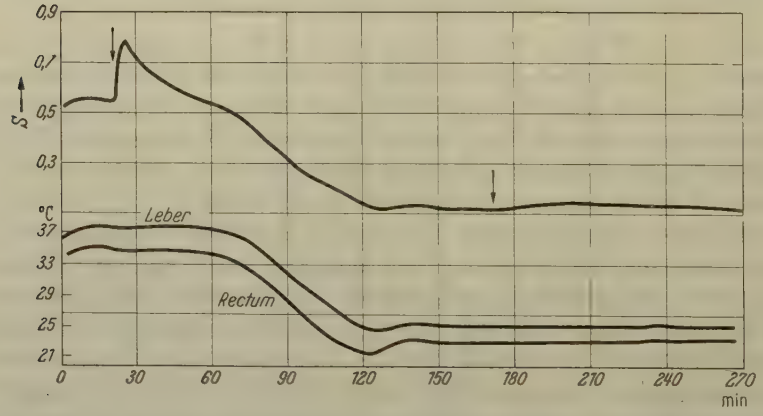


Abb. 3. Wirkung von Phenylmethylcarbinol-bernsteinsäureestersaurem Natrium (PMCB) 20 mg/kg i. v. (Ratte ♀ 150 g, Urethan 1 g/kg i. p.). Abszisse: Zeit in min. Ordinate: Sekretionsgeschwindigkeit (vgl. Abb. 1) bzw. Temperatur in ° C. Obere Kurve: Cholerese. Mittlere Kurve: Lebertemperatur. Untere Kurve: Rektaltemperatur. Pfeile: Injektionen.

temperaturabhängig wie die Dehydrocholsäure, TMCB verhält sich wie PMCB.

In allen Versuchen war die Wirkungsstärke bei niederer Temperatur geringer als bei hoher. Sie läßt sich nun auf verschiedene Weise beurteilen. Einmal kann man das erreichte Wirkungsmaximum messen und die Sekretionssteigerung direkt und prozentual angeben. Das ist für 10 Versuche in der Tabelle, Spalte 8—13 geschehen. Besser ist es aber, die Wirkung durch Integration der Wirkungskurve zu berechnen. Das habe ich auf die einfachste Weise getan, indem ich die Kurven graphisch in der gleichen Art wie oben darstellte (Abb. 2), mit einer Schere ausschnitt und das Papier auf einer Analysenwaage wog. In einigen Fällen war dabei etwas Extrapolation erforderlich, doch niemals so, daß dadurch die Ergebnisse verändert werden könnten. Bei einem Versuch (Nr. 7) wurde auf diese Auswertung der 2. Kurve verzichtet, um nicht zu stark extrapolieren zu müssen. Auf die gleiche Weise wurde die Grundsekretion unterhalb der Wirkungskurve bestimmt, so daß sich nun der Gesamteffekt der Choleretika berechnen ließ. Die Ergebnisse findet man in Spalte 12—13 der Tabelle in prozentualen Werten. Die Grundsekretion ist dabei gleich 100 gesetzt. Der Effekt der Choleretica erscheint bei dieser Berechnungsweise nicht sehr imponierend, was nur zum Teil ein Ausdruck dafür ist, daß zwar noch sicher wirkende, aber niedrige Dosen appliziert wurden. Im übrigen streuen die Werte derart, daß man sich vor weitgehenden Schlüssen hüten muß. Soviel aber ist sicher: der prozentuale Effekt der Choleretica ist bei hoher Temperatur nicht wesentlich größer als bei niedriger Temperatur. Vielmehr scheint die relative Wirkung in beiden Fällen von gleicher Größenordnung zu sein.

Absolut gesehen ist die Wirkung der Choleretica bei hoher Temperatur aber stärker als bei niedriger. Das wird klar, wenn man die Mehrsekretion in beiden Temperaturbereichen bei demselben Tier nach Integration der Wirkungskurven miteinander vergleicht (Tabelle, Spalte 16). Dann zeigt sich z. B., daß dieselbe Menge PMCB, die bei warmer Leber eine Mehrsekretion von 10 Galletropfen bewirkt, bei niederer Temperatur eine solche von 5 Tropfen erzeugt. Anscheinend hat die choleretische Wirkung den gleichen Temperaturkoeffizienten wie die normale Gallesekretion.

In Spalte 17—18 ist für die gleichen Versuche unabhängig von der Wirkungsstärke die Zeit in Minuten angegeben, die vom Ende der intravenösen Injektion bis zur Erreichung der maximalen Wirkung vergeht. Bei hoher Lebertemperatur tritt die Wirkung aller Choleretica sehr rasch ein. Nach etwa $3\frac{1}{2}$ min hat das Decholin sein Wirkungsmaximum erreicht, nach etwa 5 min das PMCB. Vielleicht ist dieser Unterschied real, jedoch ist die Differenz nach den vorliegenden Zahlen statistisch nicht gesichert. Ein anderes Bild ergibt sich jedoch bei Betrachtung der entsprechenden Zeiten bei niederer Temperatur. In jedem Falle sind die

Tabelle.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Vers. Nr.	Substanz	Dosis mg/kg	Lebertemperatur			Temperaturwechsel	Maximale Wirkung in reziproken Tropfenzeiten (min)				Maximale Wirkung in Prozent		Gesamt-Wirkung in Prozent		Gesamt-Wirkung H:N	Wirkungs-Maximum nach min		
			H	N	Differenz		H		N		H	N	H	N		H	N	Q_{10}
							Basis	Wirkg	Basis	Wirkg								
7	PMCB[1])	12	35,0	24,7	10,3	↗	0,546	1,200	0,241	0,308	269	128	—	119	—	4,5	27,8	5,88
9	PMCB	20	37,5	26,0	11,5	↗	0,681	1,053	0,278	0,371	155	133	117	119	1,96	6,0	20,0	2,85
10	PMCB	20	36,0	26,6	9,4	↗	0,750	0,909	0,292	0,364	121	124	111	114	1,46	4,3	33,0	8,75
11	PMCB	20	37,5	25,0	12,5	↗	0,522	0,789	0,122	0,145	151	120	117	112	1,91	6,6	38,3	4,09
8	TMCB[2])	10	36,7	28,7	8,0	↗	0,923	1,578	0,607	0,890	171	147	119	109	2,36	3,8	18,0	7,00
5	Decholin[3])	20	37,0	26,0	11,0	↗	0,800	1,463	0,396	0,600	183	151	119	125	1,97	4,0	7,0	1,66
6	Decholin	20	37,0	26,3	10,7	↗	1,000	1,876	0,572	0,980	188	171	125	129	1,35	2,2	5,0	2,15
12	Decholin	15	36,5	26,0	10,5	↗	0,883	3,333	0,432	1,276	377	407	139	118	1,37	3,7	9,2	2,38
13	Cholsaures-Na . .	20	36,7	26,5	1 ,2	↗	0,800	1,764	0,500	1,153	220	231	133	154	1,34	2,0	4,3	1,12
14	Cholsaures-Na . .	6	37,5	24,0	13,5	↘	1,090	1,621	0,274	0,546	149	221	122	150	1,85	2,2	6,5	2,23

[1]) Natriumsalz des Phenylmethylcarbinol-Bernsteinsäure-Esters
[2]) Natriumsalz des p-Tolylmethylcarbinol-Bernsteinsäure-Esters
[3]) Natriumdehydrocholat
H = Hohe Lebertemperatur; N = Niedrige Lebertemperatur.

Spalte 8—11: Basis = b, Wirkung = w;

Spalte 12—13: $\frac{100\,w}{b}$; Spalte 14—15: $100\,\frac{(W+B)}{B}$; Spalte 16: $W_H : W_N$; Spalte 17—18: z

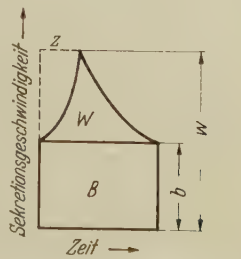


Abb. 4. Schema zur Erläuterung der Berechnungen auf der Tabelle.

Zeiten verlängert, bei PMCB und TMCB so stark gegenüber Dehydrocholinat und Cholinat, daß der Unterschied auch statistisch signifikant ist ($P = 0{,}0007$). Berechnet man den Temperaturquotienten für die Schnelligkeit des Wirkungseintritts (Spalte 19), so ergibt sich auch hier zwischen den beiden Gruppen der Choleretica ein gesicherter Unterschied ($P = 0{,}009$). Jedenfalls ist die Form der Wirkungskurven vom PMCB und Decholin zwar nicht bei hoher, wohl aber bei niederer Temperatur deutlich zu unterscheiden.

Besprechung der Ergebnisse.

1. Physiologische Fragen.

Der Temperaturquotient vieler physiologischer Vorgänge liegt zwischen 2 und 3, z. B. für die Darmperistaltik[7] und für die Frequenz des Froschherzens[8] ebenso wie für viele fermentative Vorgänge[9]. Er kann zwar auch viel höher sein, wie die der Schweißsekretion des Menschen[10], oder viel niedriger wie bei der Adenosintriphosphatase-Aktivität des Aktomyosins[11], aber die Größe des Temperaturquotienten für die Gallesekretion liegt ganz im gewöhnlichen Rahmen. Jedoch sei auf die individuellen Schwankungen des Quotienten hingewiesen. Sie zeigen, daß der Temperaturquotient eines so komplizierten Vorganges wie der Gallensekretion anders zu bewerten ist als der Quotient einer einfachen chemischen Reaktion, auch wenn dieser von gleicher Größe ist.

Die Beobachtung der Körper- und Organtemperatur scheint mir ein besonderes Problem zu beleuchten. Wie aus allen Versuchen hervorgeht, ist es möglich, die Körpertemperatur der narkotisierten Ratte in einem bestimmten Bereich auf ein gewünschtes Niveau zu bringen. Trotzdem bleibt die Leber stets wärmer, der Muskel stets kälter als das Rektum. Die Wärmeverteilung im Organismus bleibt also auch bei verschiedenem Temperaturniveau trotz der eingangs erwähnten Verschiebungen bis zu einem gewissen Grade erhalten. Das ist um so merkwürdiger, da sie auch dann erhalten bleibt, wenn Wärme von außen zugeführt wird, was eigentlich zu einer Umkehr der normalen Temperaturgradienten führen sollte. Auch Barcroft[8] fand es „surprising enough that at any one temperature all reactions of the body should progress at velocities suitable to one another".

2. Pharmakologische Fragen.

Aus der Tatsache, daß alle Choleretica das Gallevolumen bei der narkotisierten, unterkühlten Ratte nicht so stark erhöhen wie normalerweise, sollen hier keine Schlußfolgerungen für den Wirkungsmechanismus gezogen werden, zumal die Einzelwerte stark streuen. Eine geringere Arzneimittelwirkung bei niedrigeren Temperaturen erscheint nicht verwunderlich. Man muß dabei aber den Kontrast zu solchen Mitteln sehen

wie Novokain[12], Benzedrin und Strychnin[13], Dimerkaptopropanol (BAL)[14], α-Naphthylthioharnstoff (ANTU)[15] und vielen anderen, die bei niederer Temperatur auf Ratten und Mäuse stärker wirken. Es gibt dafür eine Reihe von Erklärungsmöglichkeiten, doch nur mit Hilfe unbewiesener Hypothesen.

Der verschiedene Kurvenverlauf für die Wirkung von Dehydrocholsäure und PMCB läßt vor allem 2 Deutungen zu. 1. kann darin ein anderer Wirkungsmechanismus zum Ausdruck kommen, zumal auch der qualitative Effekt verschieden ist. PMCB vermehrt die Ausscheidung der festen Gallenbestandteile neben der Wirkung auf die Flüssigkeitsausscheidung[1]. Decholin beeinflußt nur den letztgenannten Vorgang, aber es steht darin auch im Gegensatz zur Cholsäure, deren Effekt auf die Tropfenzahl sich hier nicht vom Decholin unterscheidet[16].

2. ist es möglich, daß PMCB erst durch eine Esterase gespalten werden muß, ehe es zur Wirkung kommt. Durch die Verzögerung der Spaltung bei niedriger Temperatur wäre dann der protrahierte Wirkungseintritt erklärt. Auch andere körperfremde Ester wie z. B. das Novokain werden im Organismus normalerweise rasch verseift[17]. Ein starkes Argument dafür ergibt sich aus den Beziehungen zwischen der chemischen Konstitution und Wirkung verschiedener homologer Substanzen der Phenylkarbinol- und Phenylglykol-Reihe[3]. Denn eine Veresterung ändert weder die Wirksamkeit noch die Unwirksamkeit eines Mittels. Die Esterspaltung würde bedeuten, daß aus dem wasserlöslichen PMCB-Molekül das lipoidlösliche Phenylmethylkarbinol frei wird. Damit würde auch hier die Regel gelten, daß Choleretica lipoidlöslich sein müssen.

Zusammenfassung.

1. Die narkotisierte Ratte ist als poikilothermes Versuchsobjekt brauchbar. Das Temperaturniveau läßt sich leicht auf gewünschte Werte einstellen. Die Differenz zwischen Leber- und Rektaltemperatur ist nicht ganz konstant, die Leber bleibt aber stets wärmer.

2. Der Temperaturquotient (Q_{10}) für die Gallensekretion liegt zwischen 2 und 3. Bei 39—40° Lebertemperatur ist das Maximum der Cholerese.

3. Die prozentuale Sekretionssteigerung durch Dehydrocholat (Decholin), Cholat, und die Natriumsalze der Bernsteinsäureester von Phenylmethylkarbinol (PMCB) und Tolylmethylkarbinol (TMCB) ist bei 26° und 36° C Lebertemperatur etwa gleich. Die absolute Wirkung ist bei 36° höher. (Nach Literaturangaben ist die Giftigkeit des Novokains bei niedriger Temperatur größer!)

4. Der Eintritt des maximalen Effektes vom PMCB ist im Gegensatz zur Decholinwirkung bei niedriger Temperatur stark verzögert. Wahrscheinlich muß der wasserlösliche Ester im Körper erst verseift werden, bevor das fettlösliche Phenylmethylkarbinol zur Wirkung kommt.

Literatur.

[1] Kalow, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 35 (1949). — [2] Kalow, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 43 (1949). — [3] Kalow, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 696 (1949). — [4] Elliott, H. W., and J. M. Crismon: Amer. J. Physiol. **151**, 366 (1947). — [5] Hitchcock: Bei R. Höber, Physical Chemistry of cells and tissues, S. 31. Philadelphia 1945. — [6] Harrington, L. P.: Temperature. S. 446. New York 1941. — [7] Magnus, R.: Pflügers Arch. **102**, 123 (1904). — [8] Barcroft, J.: Features in the archetecture of physiological function. Cambridge 1934. — [9] Haldane, J. B. S.: Allgem. Chemie der Enzyme. Dresden 1932. — [10] Brody, S.: Temperature. S. 462. New York 1941. — [11] Szent-Györgyi: Chemistry of muscular contraction. New York 1947. — [12] Sievers, R. F., and A. R. McIntyre: J. of Pharmacol. **59**, 90 (1937). — [13] Leser, A. J., C. H. Thiemes, and D. B. Tyler: Proc. Soc. Biol. a. Med. **45**, 682 (1940). — [14] McDonald, F. F.: Brit. J. Pharmacol. **3**, 116 (1948). — [15] Meyer, B. J., and L. Karel: J. of Pharmacol. **93**, 420 (1948). — [16] Schmidt, C. R., J. M. Beazell, A. J. Atkinson, and A. C. Ivy: Am. J. digest. Dis. a. Nutrit. **5**, 613 (1938). Zit. nach L. Goodman u. A. Gilman, Pharmacological Basis of Therapeutics. New York 1941. — [17] Brodie, B. B., P. A. Lief, and R. Poet: J. of Pharmacol. **94**, 359 (1949).

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 346—360 (1950).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Münster i. W.
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. A. Loeser).

Untersuchungen über die Pharmakologie und Toxikologie mehrwertiger Alkohole (1,3-Butylenglykol).

Von

Rudolf Kopf, Arnold Loeser, Gerda Meyer
(unter Mitarbeit von Walter Franke).

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 20. Dezember 1949.)

I. Einleitung.

Nach Untersuchungen von Loeser und Mitarbeitern[4, 7, 8] zeigen mehrwertige Alkohole, welche gleichzeitig primäre und sekundäre Hydroxylgruppen aufweisen, gegenüber solchen, die nur primäre oder nur sekundäre OH-Gruppen enthalten, eine auffallend geringe Giftigkeit. Dieser Zusammenhang zwischen der Stellung (Art) der Hydroxylgruppen in den mehrwertigen Alkoholen und ihrer Toxizität ist in Tab. 1 übersichtlich zusammengestellt. Wie wir in ausgedehnten vergleichenden Versuchen nachweisen konnten, entspricht die mittlere tödliche Dosis (LD 50) von 1,3-Butylenglykol (23,31 cm^3/kg Körpergewicht) für die Maus per os annähernd der LD 50 von wasserfreiem Glyzerin (20,71 cm^3/kg), während die LD 50 für Äthylenglykol 13,79 cm^3/kg, für 2,3-Butylenglykol 9 cm^3/kg und für 1,4-Butylenglykol sogar nur 2,14 cm^3/kg beträgt.

Die erstaunlich geringe Toxizität von mehrwertigen Alkoholen, die sowohl die Gruppe CH_2OH der primären Alkohole als auch die Gruppe CHOH der sekundären Alkohole besitzen, führte zu der Vermutung, daß sich solche Verbindungen auch in ihren sonstigen Wirkungen ähnlich verhalten. So ist schon lange bekannt, daß das 1,2-Propylenglykol[5, 10] in seinem toxikologischen Verhalten weitgehend mit dem des bekanntesten Vertreters der dreiwertigen diprimär-sekundären Alkohole, dem Glyzerin, übereinstimmt. Aus diesem Grunde haben wir bereits in früheren Untersuchungen[4, 7, 8] die toxikologischen und pharmakologischen Eigenschaften des 1,3-Butylenglykol näher analysiert und dabei in Übereinstimmung mit den Angaben von Hildebrandt[6] gefunden, daß dieser mehrwertige Alkohol bei *kurzfristiger Einwirkung* und bei den von uns verwendeten Mengen bei Menschen und bei Tieren keine Veränderungen verursacht, die auf eine Schädigung des Körpers hindeuten. Diese Versuche haben wir in der vorliegenden Arbeit ergänzt und durch solche über das Verhalten des Organismus bei *Dauerzufuhr*

Tabelle 1. *Beziehungen zwischen Toxizität und Stellung der Hydroxylgruppen in mehrwertigen Alkoholen*.*

Substanz	Konstitution	LD 50 per os cm³/kg Maus (24 Std)
I. Zweiwertige diprimäre Alkohole.		
Äthylenglykol	$CH_2(OH)—CH_2(OH)$	13,79
1,3-Propylenglykol	$CH_2(OH)—CH_2—CH_2(OH)$	6,0
1,4-Butylenglykol	$CH_2(OH)—CH_2—CH_2—CH_2(OH)$	2,14
II. Zweiwertige primär-sekundäre Alkohole.		
1,2-Propylenglykol	$CH_3—CH(OH)—CH_2(OH)$	30,76
1,3-Butylenglykol**	$CH_3—CH(OH)—CH_2—CH_2(OH)$	23,31
III. Zweiwertige disekundäre Alkohole.		
2,3-Butylenglykol	$CH_3—CH(OH)—CH(OH)—CH_3$	9,0
IV. Dreiwertige diprimär-sekundäre Alkohole.		
1,2,3-Propantriol (Glyzerin)***	$CH_2(OH)—CH(OH)—CH_2(OH)$	20,71

* Mit Ausnahme der für 1,3-Propylenglykol und 2,3-Butylenglykol angegebenen Werte sind alle anderen Zahlen eigenen Toxizitätsbestimmungen entnommen worden.

** Chemische Werke Hüls.

*** Wasserfreies Glyzerin.

von 1,3-Butylenglykol vervollständigt. Als Vergleichssubstanz diente dabei Glyzerin, welches allgemein als ungiftig gilt.

II. Chemisches.

Der als Zwischenprodukt bei der Herstellung von künstlichem Kautschuk (Buna) anfallende und dadurch leicht zugängliche zweiwertige Alkohol 1,3-Butylenglykol

$$CH_3—CH(OH)—CH_2—CH_2(OH)$$

ist in reinem Zustande eine farblose visköse Flüssigkeit von herb-süßem Geschmack und ganz leicht an Butter erinnerndem Geruch. Er ist mit

Wasser und Alkohol in allen Verhältnissen mischbar, in Äther und in Lipoidlösungsmitteln sowie in fetten Ölen unlöslich. Der Siedepunkt der reinen Verbindung liegt nach den Angaben von Salzer und Weber[9] bei 208—209°. Dieselben Autoren haben kürzlich gefunden, daß es mit Hilfe einfacher chemischer Reaktionen möglich ist, 1,3-Butylenglykol sowohl in reiner Form als auch in Gemischen mit Glyzerin, Äthylenglykol und anderen Butylenglykolen sicher nachzuweisen. Nach ihren Beobachtungen können so auch Verunreinigungen oder Verfälschungen von 1,3-Butylenglykol mit toxisch wirkenden Glykolen einwandfrei erkannt werden.

Als Beispiel seien hier nur die Farbreaktionen mit Pyrogallol, mit Vanillin, mit Guajakol sowie schließlich die Farbreaktion mit R-Säure (β-Naphtol-3,6-disulfosäure) angeführt.

Zu 1. Werden 0,1 cm³ des Untersuchungsgutes mit 2 cm³ Wasser verdünnt und anschließend vorsichtig mit 3 cm³ einer 5%igen Lösung von *Pyrogallol* in konzentrierter Schwefelsäure versetzt, so färbt sich Glyzerin tiefrot. Bei 1,3-Butylenglykol tritt zunächst ein deutlicher roter Ring auf. Wird die Lösung geschüttelt, so nimmt sie eine rotbraune Farbe an, die beim Verdünnen mit 5 cm³ H_2O in trüb-orange übergeht. Bei 1,4-Butylenglykol entsteht eine goldrote, nach Verdünnen mit Wasser rosa-violette Färbung.

Zu 2. Versetzt man 0,5 cm³ des Untersuchungsgutes mit 1 cm³ Äthanol und 0,5 cm³ einer frisch bereiteten 10%igen alkoholischen *Vanillinlösung*, so färben sich bei langsamer Zugabe von 0,5 cm³ konz. Schwefelsäure und Umschütteln Glyzerin, Äthylenglykol und 1,4-Butylenglykol rotviolett, 1,3-Butylenglykol tiefblau.

Zu 3. 0,1 cm³ des Untersuchungsgutes werden mit 10 cm³ frisch bereitetem Bromwasser (0,3 cm³ Brom in 100 cm³ H_2O) versetzt und im verschlossenen Gefäß 20 min auf dem Wasserbad erwärmt. Nach dem Vertreiben des überschüssigen Broms werden 0,4 cm³ des oxydierten Untersuchungsgutes mit 0,1 cm³ einer 4%igen Kaliumbromidlösung und vorsichtig mit 2 cm³ konz. Schwefelsäure versetzt. Gibt man nach kurzem Abkühlen zu der jetzt intensiv gelben Flüssigkeit 1 cm³ einer 5%igen alkoholischen Lösung von *Guajakol* und schüttelt kurz durch, so verschwindet bei Anwesenheit von Glyzerin die Gelbfärbung, und die Lösung färbt sich intensiv blau. Bei Äthylenglykol entsteht nach der Entfärbung eine schwach rosa-violette Färbung. Bei 1,3-Butylenglykol wird die Gelbfärbung allmählich intensiver, während die Lösung bei 1,4-Butylenglykol zunächst farblos und anschließend violett wird. Sämtliche Färbungen werden deutlicher, wenn die Proben 2 min auf dem Wasserbad erwärmt werden.

Zu 4. 0,5 cm³ des verdünnten Untersuchungsgutes werden mit 5 cm³ Bromwasser 20 min auf dem Wasserbad oxydiert. Anschließend wird das überschüssige Brom durch Erwärmen vertrieben. Fügt man jetzt 3 cm³ einer Lösung von 1 Teil *R-Säure* (β-Naphtol-3,6-disulfosäure) in 300 Teilen konz. Schwefelsäure zu, so entsteht bei Anwesenheit von Glyzerin und Äthylenglykol ein grünblauer, bei 1,3-Butylenglykol ein zitronengelber und bei 1,4-Butylenglykol ein erikaroter Ring.

Bezüglich der anderen Reaktionen, wie Bestimmung der Hydroxylzahl, Siedepunkt, Reduktion von Nesslers Reagens, Löslichkeit von Jod, Wasserabspaltung mit Kaliumbisulfat und anschließender Reaktion der gebildeten ungesättigten Produkte mit Nesslers Reagens bzw. Nitro-

prussidnatrium und Piperidin u. a. m. sei auf die Originalarbeit von Salzer und Weber[9] verwiesen.

III. Allgemeine Wirkungen.

Als Alkohol wirkt 1,3-Butylenglykol, in hohen Dosen gegeben, bei Mäusen, Ratten, Meerschweinchen und Katzen *narkotisch*. Schon 10 bis 20 min nach oraler, subkutaner oder intramuskulärer und noch schneller nach intravenöser Verabfolgung der Substanz werden die Tiere träge, müde und schläfrig, nehmen Bauchlage ein, zeigen Tonusverlust der Muskulatur, beschleunigte Atmung sowie später Seitenlage und Krampfatmung. Wird die Dosis noch weiter erhöht, so wird die Narkose bald tiefer, die Reflexe schwinden, und die Tiere gehen schließlich an Atemlähmung zugrunde.

Die *mittleren tödlichen Dosen* (LD 50) für Maus und Ratte sind abhängig von dem Reinheitsgrad des 1,3-Butylenglykol. Sie betragen bei der Maus nach oraler Verabfolgung für technisches 1,3-Butylenglykol 19,16 cm³/kg, für reines* 23,31 cm³/kg.

Von der tierischen *Haut* wird 1,3-Butylenglykol selbst in unverdünntem Zustande reaktionslos vertragen (Ratten, Kaninchen). Dabei ist es gleichgültig, ob die Haut unversehrt oder künstlich verletzt ist.

So blieben bei Meerschweinchen, denen 14 Tage lang auf die geschorene unverletzte Bauchhaut oder 4 Tage lang auf die rasierte und mit einem Skalpell künstlich verletzte Haut einmal täglich für 2 Std etwa 20 cm³ unverdünntes 1,3-Butylenglykol je Kilogramm Körpergewicht aufgetragen wurden, irgendwelche krankhaften Veränderungen aus. Obwohl die aufgebrachte Menge bei Meerschweinchen, subkutan gegeben, ausreicht, um eine Narkose hervorzurufen, fehlten sowohl während als auch nach Einwirkung von 1,3-Butylenglykol alle Erscheinungen, die für eine schnelle Aufnahme größerer Mengen dieses mehrwertigen Alkohols durch die Haut gesprochen hätten. Leber, Nieren und Blase zeigten bei der histologischen Untersuchung keine Besonderheiten. Der Harn war bei allen Tieren frei von Eiweiß und Blutfarbstoff.

Ebensowenig wie die Haut werden auch die *Schleimhäute* durch 1,3-Butylenglykol beeinflußt.

Weder beim Einträufeln von unverdünntem 1,3-Butylenglykol in das Auge von Kaninchen und Hund noch beim Aufbringen von 1,3-Butylenglykol auf die Mund- oder Magenschleimhaut von Hunden konnten wir irgendwelche sichtbaren Veränderungen oder Störungen beobachten. Cornealreflex und Pupillenreaktion verhielten sich normal. Auch auf die Schleimhaut des Dickdarmes hat 1,3-Butylenglykol keinen merklichen Einfluß. Wie in anderem Zusammenhang[2] gezeigt werden soll, bleiben bei Ratten, Meerschweinchen und Hunden daher Einläufe mit 1,3-Butylenglykol im Gegensatz zu solchen mit gleichen Mengen Glyzerin DAB VI unwirksam.

Die gute Verträglichkeit von 1,3-Butylenglykol bei äußerlicher Anwendung ist auch bei der intrakutanen, subkutanen, intramuskulären

* $d\,\frac{20}{4} = 1{,}0046$; $n\,\frac{20°}{D} = 1{,}4398$; Kp 208—209° (760 mm Hg).

und intravenösen Verabfolgung von unverdünntem oder mit 50% Wasser verdünntem 1,3-Butylenglykol nachzuweisen. Sowohl bei Hunden als auch bei Kaninchen, Ratten und Mäusen traten an den Einstichstellen keine örtlichen Reaktionen auf. Sie fehlten auch, wenn Ratten an derselben Stelle an 5 aufeinanderfolgenden Tagen täglich eine 50%ige wäßrige 1,3-Butylenglykol-Lösung bzw. unverdünntes 1,3-Butylenglykol unter die Haut (0,5 cm³) oder in die Muskulatur (0,25 cm³) injiziert wurde. Als Vergleichssubstanzen verwendeten wir bei diesen Versuchen gleiche Mengen physiologischer Kochsalzlösung bzw. Olivenöl. Verschiedenheiten in der Struktur des Gewebes (Unterhautzellgewebe, Muskulatur) konnten bei der histologischen Untersuchung nach Einwirkung der drei erwähnten Substanzen — 1,3-Butylenglykol, 0,9%ige NaCl-Lösung, Olivenöl — nicht nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde gefunden:

Der *Blutdruck* wird nach i.v. Injektion großer Mengen von 1,3-Butylenglykol oder Glyzerin (0,5 cm³ einer 50%igen wäßrigen Lösung bzw. 1,0 cm³ oder 2,0 cm³ der unverdünnten Substanzen) bei Kaninchen und Hund gesenkt. Gleichzeitig wird die *Atmung* beschleunigt. Dauer und Ausmaß der Wirkung sind dabei abhängig von der Größe der verabfolgten Dosis.

Stoffwechsel (Ratten) und *Zuckergehalt des Blutes* (Kaninchen) verhalten sich nach Einwirkung von 1,3-Butylenglykol nciht anders wie nach Verabfolgung von Glyzerin.

Hämoglobingehalt, Zahl der Erythrozyten und Leukozyten sowie die Werte des weißen *Blutbildes* waren bei 30 etwa 75—100 g schweren Ratten, die für die Dauer von 44 Tagen je 100 g Körpergewicht täglich 1,0 cm³ einer 10%igen Lösung von 1,3-Butylenglykol (10 Tiere) in Wasser oder 1,0 cm³ einer 10%igen wäßrigen Glyzerinlösung (10 Tiere) bzw. täglich 1,0 cm³ destilliertes Wasser (10 Tiere) per os (Schlundsonde) erhalten hatten, im wesentlichen gleichsinnig.

Die spektroskopische Untersuchung des Blutes ergab keinen Anhaltspunkt für die Bildung von Methämoglobin (Ratten, Katze).

Eine ähnliche Übereinstimmung zeigte sich auch bei Versuchen in vitro, in denen wir die *hämolytische Wirkung* von 1,3-Butylenglykol auf das menschliche Blut im Vergleich zu der von Glyzerin prüften. Dabei wurde gefunden, daß beide Substanzen während des 12 Std dauernden Versuches erst in einer Konzentration über 40% in 0,9%iger Kochsalzlösung eine Hämolyse hervorriefen. In *vivo* verursachte Glyzerin bei Mäusen, Ratten, Kaninchen und Katzen schon wenige Minuten nach *subkutaner* Injektion subletaler (beispielsweise 1—2 cm³/kg) Dosen eine Ausscheidung von rotem Farbstoff im Harn, eine Wirkung, die 1,3-Butylenglykol selbst dann nicht hat, wenn tödliche Mengen gegeben werden. Auf diesen bemerkenswerten Befund wird an anderer Stelle näher eingegangen werden[1].

Die normale *Körpertemperatur* von Kaninchen weist nach innerlicher Verabreichung von 1,3-Butylenglykol (1,0 cm^3/kg, Schlundsonde) dieselben individuellen Tagesschwankungen auf wie nach Verabfolgung gleicher Mengen Glyzerin DAB VI oder Wasser. Die Messungen erfolgten rektal (Thermoelement).

Auf *glattmuskuläre Organe* (isolierter Uterus, Meerschweinchen; isolierter Dünndarm, Ratten) wirkt 1,3-Butylenglykol in Konzentrationen von 1:40—1:100 erschlaffend. In gleicher Weise wie der isolierte Dünndarm wird auch der isolierte Enddarm der Ratte unter der Einwirkung von 1,3-Butylenglykol zur Erschlaffung gebracht. Diese Tatsache verdient deshalb hervorgehoben zu werden, weil sie vielleicht eine Erklärung für die schon erwähnte Beobachtung gibt, daß Einläufe mit 1,3-Butylenglykol bei der Ratte und bei anderen Tieren (Hund, Meerschweinchen) wirkungslos bleiben.

Die geringe Giftigkeit von 1,3-Butylenglykol hängt vermutlich damit zusammen, daß der Körper diesen mehrwertigen Alkohol zum Teil in unveränderter Form — bei Hunden 10—20% — im Harn ausscheidet, zum Teil vielleicht über Azetessigsäure und Azeton, d. h. über normale Zwischenprodukte des intermediären Stoffwechsels, zu Kohlendioxyd und Wasser verbrennt. Es lag daher nahe, noch zu prüfen, wie sich der Organismus bei Dauerzufuhr von 1,3-Butylenglykol verhält.

IV. Das Verhalten des Organismus bei langfristiger Einwirkung von 1,3-Butylenglykol.

In früheren Untersuchungen wurde von Fischer, Kopf, Loeser, Meyer[4] bereits nachgewiesen, daß 1,3-Butylenglykol bei 44tägiger Verabfolgung von täglich 1,0 cm^3 einer 1%igen, 5%igen, 10%igen oder 20%igen wäßrigen Lösung je 100 g Körpergewicht Ratte Allgemeinzustand, Wachstum, Sauerstoffverbrauch und Blutbild unbeeinflußt läßt. Insbesondere fehlten pathologische Veränderungen in den Nieren, in der Leber und in der Blase. Das Ausbleiben gesundheitsschädlicher Wirkungen ist deshalb besonders hervorzuheben, weil den Tieren während der 44tägigen Versuchszeit als Gesamtmenge zum Teil annähernd die einfache bzw. die doppelte oder etwas mehr als die dreifache mittlere tödliche Dosis (Ratte) von 1,3-Butylenglykol zugeführt wurde.

Diese Untersuchungen haben wir mit modifizierter Methode bei Ratten und Hunden über einen Zeitraum von 185 Tagen ausgedehnt und dabei die nachstehend aufgeführten Ergebnisse erhalten.

1. Versuche an Ratten.

500 männliche und weibliche Ratten im Gewichte von 85—216 g, die unter gleichmäßigen Bedingungen gehalten und mit Küchenabfällen und Hafer gefüttert wurden, wurden in drei Gruppen eingeteilt. Der ersten Gruppe verabreichten wir

je 100 g Körpergewicht zweimal wöchentlich 0,5 cm³ (101 Ratten) bzw. 1,0 cm³ (100 Ratten) einer 50%igen wäßrigen 1,3-Butylenglykol-Lösung, der zweiten 0,5 cm³ (100 Ratten) bzw. 1,0 cm³ (100 Ratten) einer 50%igen wäßrigen Lösung

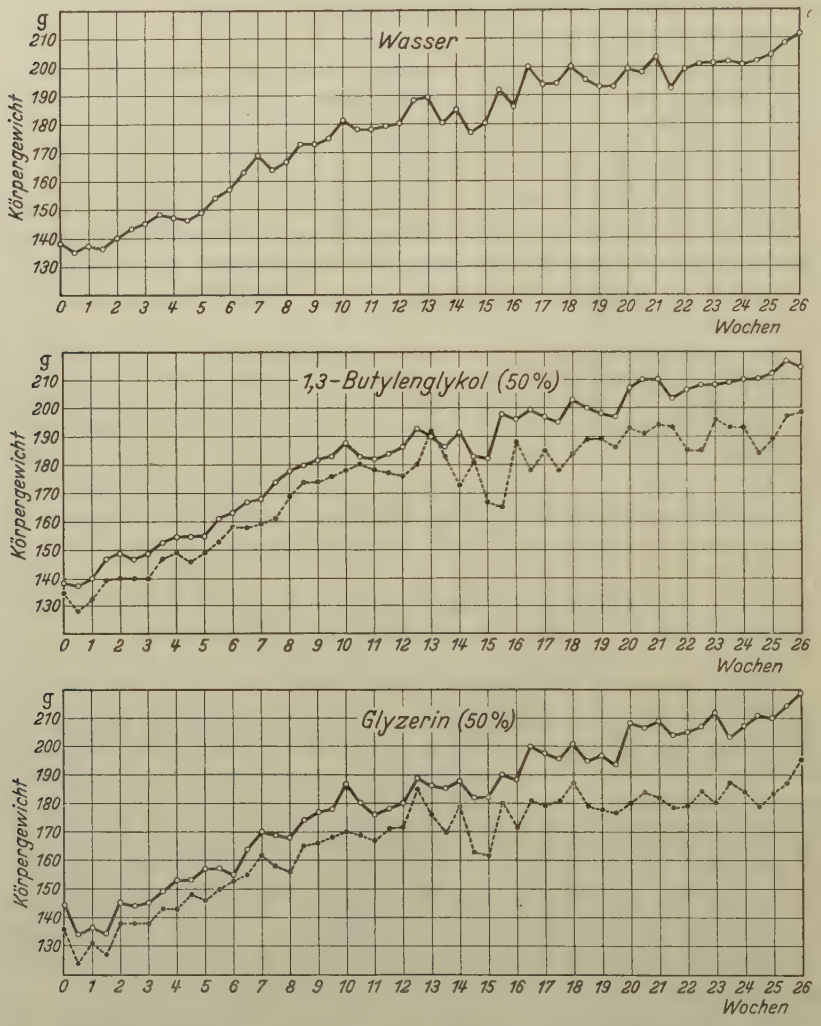


Abb. 1. Wachstumskurven von Ratten nach Verabfolgung von Wasser, 1,3-Butylenglykol bzw. Glyzerin DAB VI per os (Schlundsonde). Versuchszeit: 26 Wochen. Die Zufuhr der einzelnen Substanzen erfolgte zweimal wöchentlich in regelmäßigen Abständen von 3—4 Tagen. Dosis je 100 g Körpergewicht:
——— 1,0 cm³ Wasser, 1,0 cm³ einer 50%igen wäßrigen Lösung von 1,3-Butylenglykol und 1,0 cm³ einer 50%igen wäßrigen Lösung von Glyzerin. - - - - - - - - 0,5 cm³ einer 50%igen wäßrigen Lösung von 1,3-Butylenglykol und 0,5 cm³ einer 50%igen wäßrigen Lösung von Glyzerin. Abszisse: Zeit in Wochen. Ordinate: Körpergewicht in Gramm. Jeder Punkt der einzelnen Kurven entspricht in der Zeit vom 1.—45. Tag dem Mittelwert von 99—101 Tieren, in der Zeit vom 46.—94. Tag dem von 75—82 Tieren, in der Zeit vom 95.—140. Tag dem von 54—66 Tieren, in der Zeit vom 141. Tag bis Versuchsende dem von 34—53 Tieren.

von Glyzerin DAB VI*. Die dritte Gruppe erhielt 1,0 cm³ Wasser (99 Ratten) pro 100 g Körpergewicht. Die Dauer der Untersuchungen betrug 45—185 Tage. Sie erstreckten sich über die Monate Mai—November 1949. Die Zufuhr der einzelnen Substanzen erfolgte bei allen Tieren per os (Schlundsonde) in regelmäßigen Abständen von 3—4 Tagen. Während der Versuchszeit wurde das Allgemeinverhalten der Tiere beobachtet und zweimal wöchentlich ihr Körpergewicht kontrolliert. Am 45., 94., 140. und 185. Versuchstage töteten wir jeweils 10 Ratten, die Wasser, 30 Ratten, die zur Hälfte 0,5 cm³, zur anderen Hälfte 1,0 cm³ 1,3-Butylenglykol-Lösung sowie 30 Ratten, die 0,5 cm³ oder 1,0 cm³ Glyzerinlösung erhalten hatten und untersuchten ihre Organe histologisch.

a) Wirkung auf Allgemeinverhalten und Körpergewicht.

Ratten, denen im Verlauf von 45, 94, 140 und 185 Tagen die zweifache, vierfache oder annähernd die sieben- bzw. neunfache mittlere tödliche Dosis (Ratte) 1,3-Butylenglykol per os verabfolgt worden war, zeigten in ihrem Allgemeinverhalten und in ihrer Entwicklung keine Unterschiede gegenüber Tieren, welche zu derselben Zeit annähernd die gleiche absolute Menge Glyzerin oder aber Wasser erhalten hatten. Sie putzten sich, waren munter und angriffslustig. Insbesondere fehlten Zeichen einer chronischen Intoxikation. Bei allen Gruppen nahm das Körpergewicht der Tiere, wie aus Abb. 1 (S. 352) hervorgeht, im Mittel übereinstimmend zu. Dabei ist besonders hervorzuheben, daß auch das Gewicht jugendlicher Ratten, die gegen chronisch einwirkende Gifte bekanntlich besonders empfindlich sind, kontinuierlich anstieg. Hinsichtlich der Letalität fanden wir bei den mit 1,3-Butylenglykol und Wasser behandelten Tieren keinen Unterschied.

b) Wirkung auf den Glykogengehalt der Leber.

Wie aus Tab. 2 (S. 354) zu entnehmen ist, war der Glykogengehalt der Leber von Ratten, die zweimal wöchentlich je 100 g Körpergewicht 1,0 cm³ einer 50%igen wäßrigen 1,3-Butylenglykol- bzw. Glyzerinlösung oder die gleiche Menge Wasser per os erhalten hatten, am 180. Versuchstage im wesentlichen gleich. Die Durchschnittswerte von je 10 Tieren betrugen nach Zufuhr von Wasser 2,24%, nach Zufuhr von 1,3-Butylenglykol 2,44% und nach Verabfolgung von Glyzerin 2,55%. Vor Ausführung der Glykogenbestimmung (Pflüger-Bertrand[3]) ließen wir die Tiere 8 Std hungern, gaben ihnen darauf je 100 g Körpergewicht 0,75 g Lävulose als 50%ige wäßrige Lösung mit der Schlundsonde ein und töteten sie 6 Std nach der Kohlenhydratzufuhr durch Entbluten.

c) Wirkung auf das Blutbild.

Die Wirkung von 1,3-Butylenglykol auf das Blut untersuchten wir an 20 männlichen 138—186 g schweren Ratten, denen pro 100 g Körper-

* Glyzerin DAB VI enthält 83—87% Glyzerin.

Tabelle 2. *Der Einfluß von Wasser bzw. 1,3-Butylenglykol oder Glyzerin DAB VI auf den Glykogengehalt der Leber von Ratten.*

(Dosis: 1,0 cm³ Wasser bzw. 1,0 cm³ einer 50%igen wäßrigen Lösung von 1,3-Butylenglykol oder Glyzerin je 100 g Körpergewicht zweimal wöchentlich in regelmäßigen Abständen von 3—4 Tagen. Versuchszeit: 185 Tage.)

Tier Nr.	Tiergewicht in g zu Beginn des Versuches	Tiergewicht in g am Ende des Versuches	Gewicht der Leber in g	Leberglykogen in mg	Leberglykogen in %
			Wasser		
2343	125	180	5,00	130,9	2,61
2344	140	180	4,60	144,9	3,15
2345	130	170	4,35	108,3	2,48
2346	140	170	4,10	146,5	3,57
2347	150	170	4,50	107,9	2,39
2388	147	275	7,05	89,4	1,26
2389	134	215	4,60	35,1	0,76
2390	108	300	6,85	154,9	2,26
2391	85	180	4,40	71,2	1,61
2395	110	205	4,20	97,5	2,32
				Mittelwert:	2,24
			1,3-Butylenglykol		
1944	180	263	4,85	119,0	2,45
1946	146	220	3,70	93,4	2,55
1947	176	230	4,50	76,0	1,69
1948	150	325	7,60	195,8	2,57
1950	138	275	6,00	122,7	2,04
2097	140	195	2,75	70,1	2,55
2074	104	125	3,40	45,6	1,34
2077	113	140	3,55	81,6	2,29
2079	95	155	4,50	148,7	3,30
2084	131	170	4,35	159,4	3,66
				Mittelwert:	2,44
			Glyzerin		
2143	145	220	4,85	99,4	2,04
2144	160	270	5,65	171,7	3,03
2145	160	205	3,95	104,6	2,64
2146	165	230	5,80	212,1	3,65
2147	165	255	5,60	202,5	3,61
2266	125	175	3,40	92,3	2,71
2267	115	190	5,05	56,7	1,12
2268	110	180	5,40	147,2	2,72
2272	100	160	4,15	108,3	2,60
2278	115	140	4,60	62,3	1,35
				Mittelwert:	2,55

gewicht zweimal wöchentlich 1,0 cm³ einer 50%igen wäßrigen 1,3-Butylenglykol-Lösung mit der Schlundsonde verabreicht wurde. Zum Vergleich erhielten 40 gleichschwere Tiere während derselben Zeit die ent-

sprechenden Mengen einer 50%igen wäßrigen Glyzerinlösung (20 Ratten) bzw. Wasser (20 Ratten). Die Untersuchungen des peripheren Blutes erfolgten in Abständen von 4 Wochen. Das Blut wurde aus der Schwanzvene der Tiere entnommen und nach den in der Klinik gebräuchlichen hämatologischen Methoden — Bestimmung des Hämoglobin nach Sahli, Zählung der Erythrozyten und Leukozyten mittels der üblichen Pipetten in der Thoma-Zählkammer, Differentialblutbild: Färbung nach Pappenheim, Auswertung nach Schilling — untersucht.

Dabei ergab sich ebenso wie bei den bereits erwähnten kurzfristigeren Versuchen (44 Tage) kein Hinweis für eine Schädigung des Blutbildes (Abb. 2, S. 356). Insbesondere fanden wir bei Versuchs- und Vergleichstieren keine wesentlichen Abweichungen des Hämoglobingehaltes, der Zahl der Erythrozyten und Leukozyten sowie der Werte des Differentialblutbildes. Die in allen Tiergruppen zu bemerkende Zunahme der eosinophilen Zellen beruhte wahrscheinlich auf einer Wurminfektion, eine Vermutung, die durch die Sektion bestätigt wurde. Der leichte Anstieg des Kernverschiebungsindex ist auf eine vermehrte Ausschüttung von Stabkernigen und Jugendlichen zurückzuführen und findet sich sowohl bei Versuchs- als auch bei Vergleichstieren. Es braucht ihm deshalb wohl keine besondere Bedeutung zugemessen zu werden.

d) Wirkung auf Knochensystem und Zähne.

Um den Einfluß von 1,3-Butylenglykol auf Knochenwachstum und -struktur sowie auf den Zahn und seinen Halteapparat kennenzulernen und möglicherweise auftretende Schäden in ihrer Entwicklung verfolgen zu können, unterzogen wir einen Teil der Ratten wiederholten Röntgenuntersuchungen. Bei 6 Tieren, denen eine 50%ige wäßrige 1,3-Butylenglykol-Lösung und bei je 5 Tieren, denen eine 50%ige wäßrige Glyzerinlösung bzw. Wasser zweimal wöchentlich in einer Menge von 0,5 cm^3 bzw. 1,0 cm^3 verabfolgt worden war, wurden in der 10., 19. und 25. Woche die unteren Schneidezähne sowie Femur und Tibia geröntgt. Anzeichen von Schädigungen waren bei keinem Tier zu finden. Die Epiphysenfugen verhielten sich der Röntgendarstellung nach bei allen Gruppen gleich. Hinweise auf eine Demineralisation oder Sklerosierung des Knochens sowie auf röntgenologisch darstellbare Veränderungen des Zahnes bzw. des Kieferknochens waren nicht vorhanden. Die Röntgenaufnahmen von Tieren der 1,3-Butylenglykol-Gruppe boten vielmehr zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung das gleiche Bild wie die von Ratten, denen Glyzerin oder Wasser verabfolgt worden war.

e) Verhalten von Leber, Nieren, Blase, Darm und Gehirn.

Am 45., 94., 140. und 185. Versuchstage wurden jeweils 30 Ratten, denen wir zur Hälfte 0,5 cm^3, zur anderen Hälfte 1,0 cm^3 einer 50%igen

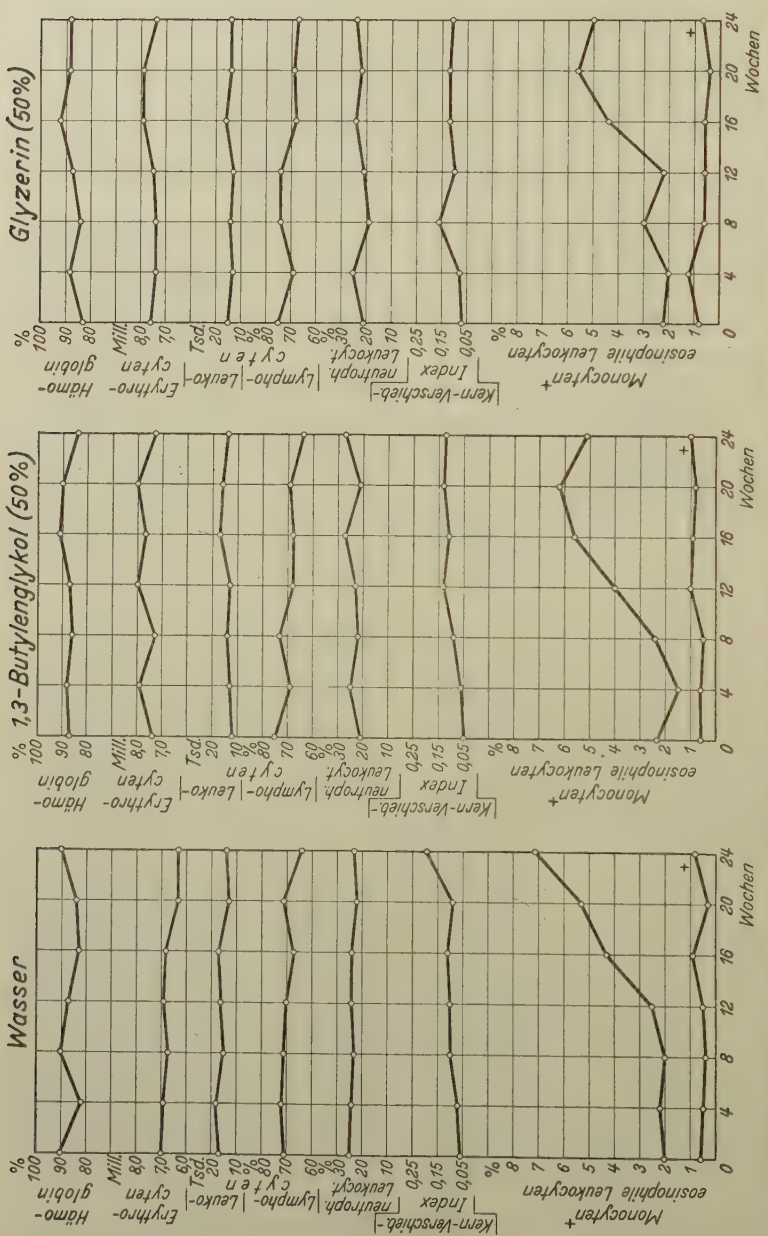


Abb. 2. Differentialblutbild von Ratten nach Einwirkung von 1,0 cm³ einer 50%igen wäßrigen Lösung von 1,3-Butylenglykol bzw. Glyzerin DAB VI oder Wasser je 100 g Körpergewicht. Versuchszeit: 168 Tage (24 Wochen). Verabfolgung: zweimal wöchentlich in regelmäßigen Abständen von 3 – 4 Tagen. Monatliche Blutentnahme. Die Punkte der einzelnen Kurven entsprechen den Mittelwerten von je 20 Tieren. Abszisse: Zeit in Wochen. Ordinate: Hämoglobin in Prozent, Erythrozyten in Millionen, Leukozyten in Tausend, neutrophile und eosinophile Leukozyten, Lymphozyten sowie Monozyten in Prozent und Kernverschiebungsindex.

wäßrigen 1,3-Butylenglykol-Lösung, 30 Ratten, denen wir 0,5 cm³ oder 1,0 cm³ einer 50%igen wäßrigen Glyzerinlösung und 10 Ratten, denen wir 1,0 cm³ Wasser zugeführt hatten, durch Entbluten getötet. Leber, Nieren, Blase, bei einem Teil der Tiere auch Dünndarm wurden entnommen und histologisch untersucht. Gleichgültig, ob die Tiere (Versuchs- und Vergleichstiere) am 45. oder 94., 140. oder am 185. Versuchstage getötet worden waren, konnten an Leber, Nieren und Blase keine pathologischen Veränderungen erkannt werden*. Kalkausfällungen in den Harnkanälchen, wie sie gelegentlich bei den behandelten Ratten beobachtet wurden, sahen wir auch bei den Tieren, die Wasser erhalten hatten. Das histologische Bild der Darmschleimhaut unterschied sich bei den Versuchstieren nicht von dem der Vergleichsratten. Die Schnittflächen des Gehirns zeigten bei allen Tieren makroskopisch keine Besonderheiten. Bei einem Teil der Ratten fanden sich Wurmeier in der Blase, Würmer in der Leber und in den Nierenkelchen. In einem Falle wurden abgekapselte Würmer in dem Fettgewebe des Nierenlagers festgestellt.

f) Beeinflussung der endokrinen Organe.

Die Funktion der endokrinen Organe war bei unseren Versuchstieren nicht geändert. So konnten wir beispielsweise bei orientierenden Untersuchungen des Scheidenabstriches von Ratten, denen wir während 26 Wochen zweimal wöchentlich 0,5 cm³ bzw. 1,0 cm³ einer 50%igen wäßrigen 1,3-Butylenglykol-Lösung verabfolgt hatten, keine Störungen des Zyklus nachweisen. Ebenso boten die endokrinen Drüsen der am 45., 94., 140. und 185. Versuchstage getöteten Ratten bei der Sektion makroskopisch keine Veränderungen gegenüber der Norm. Auch die Mittelwerte (Tab. 3, S. 358) der auf 100 g Körpergewicht bezogenen Gewichte der endokrinen Organe zeigten keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zu denen von Tieren, die mit entsprechenden Mengen Glyzerin oder Wasser gefüttert worden waren.

2. Versuche an Hunden.

Als Versuchstiere dienten 5 (3 junge und 2 ausgewachsene) Hunde im Gewicht von 2,55—5,7 kg, die unter gleichen Bedingungen in einem Zwinger gehalten und mit Küchenabfällen unter Zusatz von gekochten Haferflocken und Lebertran gefüttert wurden. Einer Gruppe (1 ♂ junges und 1 ♀ ausgewachsenes Tier) verabreichten wir zweimal wöchentlich 2,0 cm³ einer 50%igen wäßrigen 1,3-Butylenglykol-Lösung pro Kilogramm Körpergewicht per os (Schlundsonde), einer anderen Gruppe (2 ♀ junge Tiere und 1 ♀ ausgewachsener Hund) dieselbe Menge einer 50%igen wäßrigen Lösung von Glyzerin DAB VI.

* Für die Durchsicht der histologischen Präparate sprechen wir auch an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Giese, Pathologisches Institut der Städtischen Krankenanstalten Bremen, unsern verbindlichsten Dank aus.

Tabelle 3. *Der Einfluß von 1,3-Butylenglykol und Glyzerin DAB VI auf das Gewicht innersekretorischer Organe von Ratten.*

(50%ige wäßrige Lösung per os zweimal wöchentlich in Abständen von 3—4 Tagen; Versuchszeit: 185 Tage.)

Versuchsdauer in Tagen	Zahl der Tiere ♂	Zahl der Tiere ♀	Substanz	Einzeldosis in cm³ je 100 g Ratte	Mittelgewichte innersekretorischer Drüsen in mg je 100 g Ratte: Schilddrüse	Nebennieren	Ovarien	Hypophyse
45	5	5	Kontrollen . . . (Wasser)	1,0	12,24	22,79	27,00	4,37
45	8	7	1,3-Butylenglykol	0,5	11,91	20,54	39,04	3,80
45	8	7	1,3-Butylenglykol	1,0	11,05	20,36	38,82	3,82
45	8	7	Glyzerin	0,5	11,88	20,08	47,84	4,06
45	10	5	Glyzerin	1,0	14,23	22,95	30,41	3,62
94	5	5	Kontrollen . . . (Wasser)	1,0	13,54	23,63	23,20	3,74
94	7	8	1,3-Butylenglykol	0,5	12,43	23,60	29,34	4,86
94	7	8	1,3-Butylenglykol	1,0	13,19	23,85	30,12	4,00
94	7	8	Glyzerin	0,5	15,20	24,09	26,36	4,55
94	7	8	Glyzerin	1,0	16,16	25,71	30,15	5,17
140	5	5	Kontrollen . . . (Wasser)	1,0	12,05	23,42	29,52	4,54
140	8	7	1,3-Butylenglykol	0,5	12,09	19,49	30,80	3,65
140	6	9	1,3-Butylenglykol	1,0	12,16	24,08	36,69	4,18
140	7	8	Glyzerin	0,5	12,38	24,15	26,39	3,73
140	5	10	Glyzerin	1,0	13,98	24,58	30,55	4,61
185	10	9	Kontrollen . . . (Wasser)	1,0	11,13	17,72	21,06	4,27
185	9	7	1,3-Butylenglykol	0,5	11,32	15,13	19,22	3,29
185	11	8	1,3-Butylenglykol	1,0	12,90	18,17	23,72	3,50
185	5	4	Glyzerin	0,5	11,58	19,19	19,55	3,97
185	7	7	Glyzerin	1,0	12,99	18,89	24,55	4,23

Alle Tiere vertrugen die von uns verwandten Mengen 1,3-Butylenglykol ohne Reaktion. Sie waren lebhaft und zeigten keine Störungen ihres Allgemeinbefindens und des Wachstums. Das Körpergewicht verhielt sich nicht anders wie bei den zum Vergleich mit Glyzerin behandelten Tieren. Bei wöchentlich einmal durchgeführten Urinuntersuchungen ergab sich kein Hinweis für eine Nierenschädigung: Ausscheidung von Eiweiß (Kochprobe) und Hämaturie wurden nicht festgestellt. Urobilinogen (Ehrlichs Reagens) trat nicht vermehrt auf. Die Reaktion auf Urobilin (Schlesingers Reagens) war negativ. Zucker (Trommersche Probe), Azeton (Legalsche Probe) und Azetessigsäure (Ferrichlorid) konnten nicht nachgewiesen werden.

Nach 5 Monaten wurden die jungen, nach 6 Monaten die ausgewachsenen Tiere getötet und Leber, Nieren, Blase sowie Dünndarm histologisch untersucht. Auch hier waren in den genannten Organen

keine pathologischen Veränderungen zu erkennen, wie ein Vergleich mit den Organen von 2 zu Kontrollzwecken getöteten unbehandelten männlichen Hunden ergab.

V. Zusammenfassung.

In ähnlicher Weise wie andere Vertreter der in der gemeinsamen Klasse der Glykole zusammengefaßten zweiwertigen Alkohole setzt auch 1,3-Butylenglykol als *Alkohol* die Erregbarkeit des Zentralnervensystems herab und wirkt, in hohen Dosen gegeben, bei Mäusen, Ratten, Meerschweinchen und Katzen narkotisch. Von der Mehrzahl der bisher untersuchten Glykole und Glykolderivate unterscheidet sich 1,3-Butylenglykol dadurch, daß von ihm zur Auslösung dieses Effektes wesentlich größere Dosen erforderlich sind. Lediglich vom 1,2-Propylenglykol sind bis zur narkotischen Wirkung noch größere Mengen notwendig.

In bezug auf die akute Toxizität ist der primär-sekundäre Alkohol 1,3-Butylenglykol ebenso ungiftig wie der diprimär-sekundäre Alkohol Glyzerin. Die mittlere tödliche Dosis (LD 50) beträgt für die Maus, per os gegeben, bei 1,3-Butylenglykol 23,31 cm^3/kg, bei wasserfreiem Glyzerin 20,71 cm^3/kg Körpergewicht.

Örtliche Reizwirkungen an Haut und Schleimhäuten sowie nach Injektion an den Einstichstellen treten nach Einwirkung von 1,3-Butylenglykol beim Menschen und beim Tier nicht auf.

Allgemeinstoffwechsel, Zuckergehalt des Blutes sowie Blutbild werden durch 1,3-Butylenglykol unter den angegebenen Bedingungen nicht verändert.

Früher gefundene Ergebnisse, denen zufolge Ratten 1,3-Butylenglykol ebenso gut vertragen wie Glyzerin — es wurde maximal etwa die dreifache mittlere tödliche Dosis von 1,3-Butylenglykol (Ratte) fraktioniert über 44 Tage täglich mit der Schlundsonde verabfolgt — können dahingehend erweitert werden, daß selbst die annähernd neunfache mittlere tödliche Dosis von 1,3-Butylenglykol (Ratte), welche im Laufe eines halben Jahres bei zweimal wöchentlicher Verabreichung (Schlundsonde) gegeben wurde, weder bei jungen noch bei ausgewachsenen Ratten gesundheitsschädliche Wirkungen auftreten ließ. Annähernd gleiche absolute Mengen Glyzerin erwiesen sich in unseren Versuchen als ebenso ungiftig. Beide Substanzen verursachten keine Störungen des Allgemeinverhaltens. Das Körpergewicht der Versuchstiere nahm trotz Verabreichung von 1,3-Butylenglykol oder Glyzerin ebenso zu wie das von mit Wasser gefütterten Vergleichstieren. Wiederholte Röntgenaufnahmen zeigten, daß Knochensystem und Zähne keine Veränderungen aufwiesen. Das monatlich untersuchte Blutbild blieb unverändert. Bei der Obduktion der am 45., 94., 140. und 185. Versuchstage getöteten Ratten waren an Leber, Nieren, Blase, Darm und Gehirn sowie

an den endokrinen Organen keine pathologischen Veränderungen zu erkennen. Sie fehlten auch bei der zur Sicherung vorgenommenen histologischen Untersuchung.

Hunde verhielten sich in unseren vergleichenden Versuchen ebenso wie Ratten. Auch bei ihnen waren trotz oraler Zufuhr großer Mengen von 1,3-Butylenglykol — 2,0 cm^3 pro kg Körpergewicht zweimal wöchentlich während 5 bzw. 6 Monaten als 50%ige wäßrige Lösung — die inneren Organe morphologisch ungeschädigt.

Auftreten von Eiweiß oder Blutfarbstoff im Harn wurde unter den angegebenen Bedingungen bei Menschen und Tieren nach Einwirkung von 1,3-Butylenglykol nicht beobachtet. Auch das Harnsediment blieb frei von pathologischen Bestandteilen. Zum Unterschiede von 1,3-Butylenglykol verursacht Glyzerin nach parenteraler Verabfolgung bei Tieren eine Hämoglobinurie.

Unsere in Übereinstimmung mit Hildebrandt bereits an anderer Stelle vertretene Ansicht, daß der zweiwertige primär-sekundäre Alkohol 1,3-Butylenglykol eine praktisch ungiftige Substanz sei, findet in den vorliegenden Untersuchungen eine entscheidende Stütze.

Literatur.

[1] Bornmann, G.: Pharmazie 1950, im Druck. — [2] Bornmann, G., R. Kopf u. G. Meyer: Z. exper. Med. 1950, im Druck. — [3] Siehe Eitel, H. u. A. Loeser: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **167**, 383 (1932). — [4] Fischer, L., R. Kopf, A. Loeser u. G. Meyer: Z. exper. Med. **115**, 22 (1949). — [5] Gross, E.: In Toxikologie und Hygiene der technischen Lösungsmittel, herausgeg. von K. B. Lehmann u. F. Flury, S. 192. Berlin: Springer 1938. — [6] Hildebrandt, F.: zit. nach E. Gross, in Toxikologie und Hygiene der technischen Lösungsmittel, herausgeg. von K. B. Lehmann u. F. Flury, S. 197. Berlin: Springer 1938. — [7] Hüsing, E., R. Kopf u. A. Loeser: Fette und Seifen 1949, S. 45. — [8] Loeser, A.: Pharmazie 1949, S. 263. — [9] Salzer, F. u. G. Weber: Z. f. Lebensmitteluntersuchung u. Forschung 1949, im Druck. — [10] Scholz, J.: Arch. Pharmazie usw. 1939, S. 145.

A. Loeser, Münster i. Westf., Westring 12, Pharmakol. Institut der Universität.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 361—373 (1950).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Münster i. Westf.
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. A. Loeser).

Über 1, 2, 4-Butantriol,

ein Beitrag zur Pharmakologie und Toxikologie mehrwertiger Alkohole.

Von

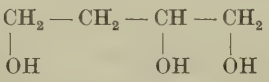
Gerhard Bornmann, Arnold Loeser und Gerda Meyer.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 20. Dezember 1949.)

I. Einleitung.

Durch neuere Entwicklungen auf dem Gebiete der Chemie des Acetylens und Kohlenoxyds (Äthinylierung, Reppe und Mitarbeiter[5]) wurde eine Reihe mehrwertiger Alkohole zugängig, deren Gewinnung bisher umständlich oder schwierig war. Hierdurch wurden wir in die Lage versetzt, unsere Untersuchungen, die sich, abgesehen vom Glyzerin, auf zweiwertige Alkohole beschränkt hatten, nun auch auf einen dreiwertigen Alkohol auszudehnen, das 1,2,4-Butantriol von der Zusammensetzung



1,2,4-Butantriol (1,2,4-Trioxybutan) ist eine gelb getönte, hoch visköse, fast geruchlose Flüssigkeit von süß-fadem Geschmack, die sich wie Glyzerin mit Wasser in jedem Verhältnis mischen läßt, in Äther und in Lipoidlösungsmitteln hingegen schwer bzw. unlöslich ist. Der Siedepunkt wird in der Literatur[1] mit 190—191° C (18 mm Hg) bzw. 179° C (13 mm Hg) angegeben. Das Molekulargewicht beträgt 106,1.

Die Gewinnung erfolgt aus Acetylen und Formaldehyd. Unter dem Einfluß von Acetylenkupfer als Katalysator entsteht zunächst Propargylalkohol, der durch Weiterbehandlung mit Formaldehyd in Butindiol überführt wird. Lagert man an Butindiol Wasser an und hydriert das sich dabei bildende 2-Ketobutandiol-1,4 katalytisch, so bildet sich hieraus 1,2,4-Butantriol.

Da in der uns zugänglichen Literatur keine Angaben über das Verhalten des Organismus bei Einwirkung von 1,2,4-Butantriol vorlagen, haben wir die pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften dieses dreiwertigen Alkohols im Vergleich zu denen von Glyzerin untersucht.

II. Methodik.

Die vorliegenden Versuche wurden in der Zeit Mai bis November 1949 vornehmlich an männlichen und weiblichen weißen Ratten von 100—180 g Gewicht durchgeführt, deren Futter aus Küchenabfällen und Hafer bestand, und die bei möglichst konstanter Temperatur in Einzelkäfigen gehalten waren. In sämtlichen Versuchen wurde die Wirkung des 1,2,4-Butantriol* — es kam unverdünnt oder als 85%ige wäßrige Lösung in Anwendung — und zu Vergleichszwecken unter denselben Bedingungen auch die des Glyzerins — verwandt wurde wasserfreies Glyzerin oder Glyzerin DAB VI** — geprüft.

III. Beobachtungen am Ganztier.

Nach oraler und subkutaner Zufuhr von 0,1 bis 0,5 cm^3 unverdünntem 1,2,4-Butantriol oder wasserfreiem Glyzerin je Kilogramm Körpergewicht zeigen Ratten und Mäuse keine Änderung ihres Verhaltens. Sie putzen sich, fressen und reagieren auf Klopfreize u. a. m. normal. Steigerung der Dosis auf 1 bis 2 cm^3 je Kilogramm beeinträchtigt das Wohlbefinden der Tiere offenbar ebenfalls nicht, obwohl nach subkutaner Injektion jetzt schon eine Erscheinung zu beobachten ist, die bei Erhöhung der Dosis regelmäßiger und weit drastischer auftritt: die Ausscheidung von rotem Farbstoff mit dem Harn. Eine derartige Wirkung ruft sowohl das Glyzerin als auch das 1,2,4-Butantriol hervor, jedoch nur nach subkutaner, nicht aber nach oraler Verabfolgung. Abgesehen von dieser auffallenden und nach subkutanen Gaben von 3 bis 8 cm^3 je Kilogramm Körpergewicht bedrohlich anmutenden Farbstoffausscheidung werden von der Ratte sowohl subkutane als auch orale Gaben solcher Mengen 1,2,4-Butantriol und Glyzerin überraschend gut vertragen.

Weitere Erhöhung der verabfolgten Substanzmengen (10 bis 18 cm^3 je Kilogramm Körpergewicht) läßt die Tiere nach etwa einer halben Stunde träge und müde werden. Sie atmen beschleunigt und nehmen Bauchlage ein, wobei die Schreckreaktion erhalten bleibt. Diese Erscheinungen bilden sich bei Anwendung subletaler Dosen nach etwa 4—5 Std zurück und sind in ihrer Stärke abhängig von der verabreichten Menge. Nach tödlichen Gaben von 1,2,4-Butantriol oder Glyzerin durchlaufen Ratte und Maus zunächst die gleichen Vergiftungsstadien, zeigen dann eine eindeutige Hyperreflexie, auf Schreckreize antworten sie mit einem Bewegungssturm und gehen schließlich — meist im Streckkrampf — zugrunde. Nach subkutaner, nicht aber nach oraler Verabreichung tödlich wirkender Mengen von 1,2,4-Butantriol kommt es so-

* Badische Anilin- und Soda-Fabrik, Ludwigshafen: (Siedeanalyse bei 5 mm Hg. Siedebeginn: 167,7° C; 0 bis 5 cm^3 0,4° C; 5 bis Ende 3,7° C). Hydroxylzahl 1546. Wassergehalt 0,12%. C = 45,79%; H = 9,18%; O = 44,9%. $d\frac{20}{4} = 1{,}1892$. Säurezahl 0,09. Verseifungszahl 2,3. Esterzahl 2,2. Karbonylzahl 0,6.

** Glyzerin DAB VI hat einen Gehalt an Glyzerin von 83—87%.

wohl bei Ratte und Maus als auch bei Kaninchen, Meerschweinchen und Katze außerdem zur profusen Ausscheidung eines roten Farbstoffes im Harn. Das Vergiftungsbild ist im übrigen auch bei Meerschweinchen und Kaninchen dem für Ratte und Maus beschriebenen ähnlich, nur ist die Unruhe und der Bewegungsdrang kurz ante finem nicht so regelmäßig zu beobachten.

Um vergleichbare Werte für die *Giftigkeit* von 1,2,4-Butantriol und Glyzerin zu bekommen, gaben wir einem großen Kollektiv von Mäusen und Ratten steigende Mengen dieser Substanzen und berechneten nach der Methode von KÄRBER die mittlere tödliche Dosis (LD 50), d. h. die Menge, bei der 50% der Versuchstiere innerhalb von 24 Std in der Norm zugrunde gehen.

Tabelle 1. *Vergleich der Toxizität von 1,2,4-Butantriol und Glyzerin bei der Maus.*

Substanz	LD 50 per os cm³/kg (24 Std)	LD 50 subkutan cm³/kg (24 Std)
1,2,4-Butantriol	23,31	12,64
Glyzerin wasserfrei	20,71	—
Glyzerin DAB VI	30,21	10,78

Als *mittlere tödliche Dosis* (LD 50) fanden wir bei der Maus 23,31 cm³ pro Kilogramm Körpergewicht (per os, Schlundsonde). Die mittlere tödliche Dosis nach subkutaner Injektion von 1,2,4-Butantriol beträgt bei Mäusen 12,64 cm³ pro Kilogramm Körpergewicht. Zum Vergleich sei die LD 50 des Glyzerins (wasserfreies Glyzerin und Glyzerin DAB VI) für die Maus angeführt (Tab. 1). Sie liegt für das wasserfreie Glyzerin bei oraler Zufuhr niedriger, für das Glyzerin DAB VI höher; bei subkutaner Injektion ist unverdünntes 1,2,4-Butantriol weniger toxisch als Glyzerin DAB VI.

Tabelle 2.
Vergleich der Toxizität von 1,2,4-Butantriol und Glyzerin bei Maus und Ratte.

Substanz	Maus LD 50 subkutan cm³/kg (24 Std)	Ratte LD 50 subkutan cm³/kg (24 Std)
1,2,4-Butantriol	12,64	11,37
Glyzerin DAB VI	10,78	16,69

Bei der Ratte war subkutan injiziertes 1,2,4-Butantriol (LD 50 = 11,37 cm³/kg Körpergewicht) giftiger als Glyzerin DAB VI (LD 50 = 16,69 cm³/kg Körpergewicht) (Tab. 2).

Einmalige orale Gaben von 1,2,4-Butantriol bewirken ebensowenig wie solche von Glyzerin auch bei noch so hoher Dosierung *Veränderungen des Urins* mit Auftreten von pathologischen Harnbestandteilen. Jedenfalls fielen die üblichen Untersuchungen — Kochprobe auf Eiweiß,

Zuckerprobe nach Trommer, Ehrlichsche und Schlesingersche Probe auf Urobilinogen und Urobilin, mikroskopische Untersuchung des Schleudersatzes — nach Verfütterung von 1,2,4-Butantriol (1,0 cm³/kg Körpergewicht, Schlundsonde) an Hunde stets negativ aus.

Auch im Selbstversuch traten während und nach 3tägiger Einnahme von 1,0 cm³ bzw. 2,0 cm³ 1,2,4-Butantriol als 50%ige Lösung weder Veränderungen des Allgemeinzustandes noch solche des Urins auf.

Subkutane Gaben beider Substanzen führen bei Ratten dagegen schon in relativ kleinen Mengen — z. B. ein Zehntel der LD 50 — zum Auftreten eines roten Farbstoffes im Harn. Bei Steigerung der Dosis wird die Färbung des Urins immer intensiver, bis der Harn schließlich nach Verabfolgung großer Mengen von 1,2,4-Butantriol oder Glyzerin tiefdunkelrot aussieht. Bei der spektroskopischen Untersuchung, zu deren Durchführung der Urin mehr oder weniger stark verdünnt werden muß, gibt der Farbstoff das typische Hämoglobinspektrum — zwei scharf getrennte Banden im grüngelben Bereich —, welches nach Zusatz eines Reduktionsmittels (z. B. Natriumhydrosulfit) in das Spektrum des reduzierten Hämoglobin — eine etwas verwaschene breite Bande in derselben Gegend — übergeht.

Im kurzwelligen Licht fluoresziert der farbstoffhaltige Harn nicht, es handelt sich also nicht um Porphyrin.

Auf die wahrscheinliche Herkunft des Farbstoffes wird bei der Besprechung der Blutveränderungen durch 1,2,4-Butantriol noch eingegangen werden.

Im *histologischen Bild** waren *Blase* und *Leber* der durch einmalige orale oder subkutane Gaben von 1,2,4-Butantriol getöteten Ratten ohne pathologische Veränderungen. Die *Nieren* boten bei den Ratten, die nach subkutaner Injektion von 1,2,4-Butantriol oder Glyzerin in vivo eine Ausscheidung von rotem Farbstoff im Harn gezeigt hatten, ein Bild, welches man nach Zufuhr hämolytisch wirkender Gifte zu sehen gewohnt ist: Hämoglobinzylinder, Erweiterung und Blutreichtum der Glomerulusschlingen. Nach oraler Verabfolgung beider Substanzen blieb die Niere von Ratten, wie unsere Versuche eindeutig ergaben, morphologisch ungeschädigt. Das gleiche gilt für die rektale Zufuhr, jedoch wurden hier nur relativ kleine Mengen (0,5 cm³ je Ratte) angewandt.

Der Einfluß auf die *Körpertemperatur* läßt sich im Rattenversuch gar nicht oder nur sehr unsicher erfassen. Aus diesem Grunde wählten wir als Versuchstier das Kaninchen und maßen an je 6 Tieren während 2 Std in Abständen von 20 min die rektale Temperatur elektrisch mit Hilfe eines 4 cm langen Meßfingers, in welchem eine Lötstelle untergebracht

* Für die Durchsicht der histologischen Präparate sprechen wir auch an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Giese, Pathologisches Institut der Städtischen Krankenanstalten Bremen, unseren verbindlichsten Dank aus.

war. Vor der Fütterung wurde die Ausgangstemperatur durch zweimalige Messung festgelegt. Weder 1,2,4-Butantriol noch Glyzerin DAB VI bewirkten nach oraler Gabe (Schlundsonde) von 1,0 cm³ je kg Körpergewicht eine Temperaturerhöhung. Länger fortgesetzte Kontrollen der Körperwärme in Abständen von je einer Stunde ließen bei den Versuchstieren nie mehr als eine ganz geringe Steigerung (etwa 0,1° C) erkennen, wie sie auch bei Tieren, welche nur mit Leitungswasser gefüttert worden waren, auftrat, und wie sie als Tagesschwankung bekannt und beschrieben ist.

IV. Verhalten einzelner Organsysteme und Beobachtungen an isolierten Organen.

Am *Applikationsort* verursachen unverdünntes 1,2,4-Butantriol oder Glyzerin DAB VI keine deutlichen, d. h. mit bloßem Auge sichtbaren Veränderungen: Wird 1,2,4-Butantriol kurzfristig auf die *Haut* gebracht, z. B. auf die geschorene Bauchhaut der Ratte, so sind ebenso wie nach Verwendung von Glyzerin keine örtlichen Reizwirkungen festzustellen. Diese bleiben selbst dann aus, wenn die Haut vor dem Versuch leicht scarifiziert wird. Entsprechend verhält sich auch die Meerschweinchenhaut. Die *Mundschleimhaut* bleibt nach oraler Zufuhr beider Substanzen ungeschädigt. Die *Konjunktivalschleimhaut* von Kaninchen und Hund zeigt nach Einträufeln von einem Tropfen 1,2,4-Butantriol oder Glyzerin keine entzündlichen Erscheinungen. Die Schleimhaut*nerven* bleiben ebenfalls unbeeinflußt; denn Hunde, die mit den Substanzen gefüttert wurden, brechen nicht. Ebenso tritt nach dem Einbringen von 1,2,4-Butantriol oder Glyzerin in den Bindehautsack von Hunden und Kaninchen keine Anästhesie der Cornea auf.

Die Pupillenreaktionen werden durch beide Substanzen, als Augentropfen gegeben, nicht beeinflußt.

Nach intrakutaner Injektion von 0,15 cm³ und nach subkutaner Verabfolgung von 0,8 cm³ 1,2,4-Butantriol (unverdünnt) sind bei Hunden und Ratten keine örtlichen Reaktionen nachzuweisen. Sie fehlen auch nach subkutaner oder intramuskulärer Zufuhr von 0,2 cm³. Intravenöse Verabreichung von 1,0 cm³ 50%igem wäßrigem 1,2,4-Butantriol verursacht an der Ohrvene vom Kaninchen keine Veränderungen. Auch nach teilweise paravenöser Injektion der 50%igen Lösung sind keine Gewebsschädigungen, insbesondere Nekrosen, nachweisbar.

Zu dem gleichen negativen Ergebnis wie die Untersuchungen am Tier führten auch Selbstversuche: bei einmaliger, 24 oder 72 Std dauernder Applikation von unverdünntem 1,2,4-Butantriol auf die unverletzte Haut des Ober- und Unterarmes blieb jede lokale Reizwirkung aus, desgleichen beim Aufbringen der Substanz auf die Mund- und Zungenschleimhaut. Die intrakutane (0,2 cm³) und die subkutane (0,2 bzw. 0,4 cm³) Injektion von bei 100° C sterilisiertem 1,2,4-Butantriol (50%ige Lösung in physiologischer Kochsalzlösung) hinterließ, abgesehen von

einem bald abklingenden Brennen, keine Erscheinungen an den Einstichstellen. Auch bei fortgesetzter täglicher Anwendung (4 Wochen) einer für Prüfzwecke angefertigten Zahnpasta (der Gehalt an 1,2,4-Butantriol betrug 44%) fehlten bei allen Versuchspersonen örtliche Veränderungen sowie Anzeichen einer Nierenschädigung oder Störungen des Allgemeinbefindens.

Blutdruck und *Atmung* von Hunden und Kaninchen werden durch intravenöse Gaben von 0,2 cm³ (als 20%ige Lösung) 1,2,4-Butantriol nicht deutlich verändert. Steigerung der Dosis auf 0,5 cm³ als 50%ige Lösung oder 1—2 cm³ unverdünnter Substanz verursacht Blutdrucksenkung und Frequenzerhöhung der Atmung, jedoch normalisieren sich beide in kurzer Zeit wieder. Dieses Verhalten stimmt auffallend mit der Wirkung gleicher Mengen Glyzerin in gleicher Konzentration überein[4]. Ausmaß und Dauer der Senkung lassen keinen sicher verwertbaren Unterschied zwischen den beiden Substanzen erkennen.

Von den Organen beansprucht das Verhalten des *Darmes* besonderes Interesse. Wir haben aus diesem Grunde neben der Abführwirkung auch das Verhalten des isolierten End- und Dünndarmes untersucht. Als *Einlauf* gegeben bewirkt 1,2,4-Butantriol am Ganztier (unverdünnt, 0,5 cm³ bei der Ratte, 1,0 cm³ beim Meerschweinchen, 5,0 cm³ beim Hund) ebenso sicher wie gleiche Mengen Glyzerin DAB VI Darmentleerungen (Tab. 3)[2]. Änderungen im Allgemeinverhalten der Tiere wurden dabei nicht beobachtet.

Tabelle 3.

Abführwirkung von 1,2,4-Butantriol und Glyzerin bei verschiedenen Tierarten.

Substanz	Verabreichte Substanzmenge je Tier in cm³ (rektal)	Versuchstier	Tierzahl	Abführwirkung
1,2,4-Butantriol . .	0,5	Ratte*	10	+
	5,0	Hund	3	+
	1,0	Meerschweinchen	10	+
Glyzerin DAB VI .	0,5	Ratte*	10	+
	5,0	Hund	3	+
	1,0	Meerschweinchen	13	+
0,9%ige NaCl-Lösung	0,5	Ratte*	10	—
	1,0	Meerschweinchen	5	—

* Die Untersuchungen wurden in Urethan-Narkose ausgeführt.

An der *Darmschleimhaut* kommt es, abgesehen von einer gelegentlich erkennbaren Hyperämie, nach der rektalen Zufuhr von Glyzerin DAB VI und 1,2,4-Butantriol zu keiner anderen makroskopisch sichtbaren Veränderung. Jedoch sieht man im histologischen Bild neben den regelmäßig zu beobachtenden Zeichen der Hyperämie oft einige Leukozyten im Schleim des Rektums und eine Abschilferung der Epithelien auf der Höhe der Falten, Veränderungen, wie sie nach rektaler Gabe von physiologischer Kochsalzlösung ungewöhnlich sind. Diese Erscheinung kann damit zusammenhängen, daß nach Einführung von 1,2,4-Butantriol bzw. Glyzerin DAB VI eine deutliche, meist recht drastische Entleerung des

Darmes erfolgt. Sie könnte aber auch auf eine lokale Reizwirkung der Substanzen zurückzuführen sein. Hier genügt es festzustellen, daß zwischen 1,2,4-Butantriol und Glyzerin DAB VI hinsichtlich ihres Einflusses auf die Schleimhaut des Enddarmes kein Unterschied besteht. Beide mögen die Schleimhaut stärker irritieren als etwa physiologische Kochsalzlösung; sie rufen aber sicher keine Verschorfungen, Verätzungen oder ähnliches hervor.

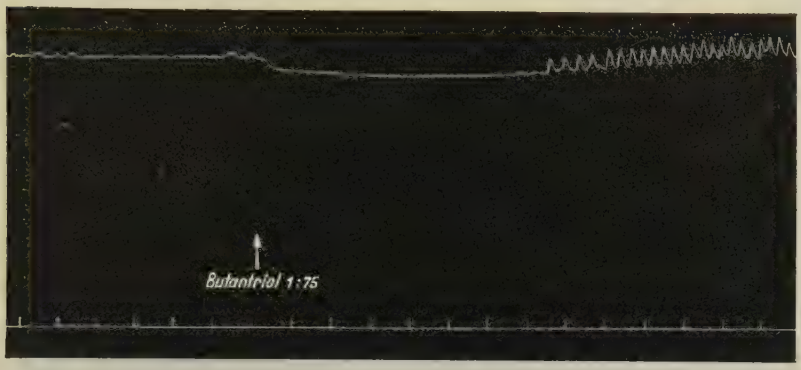


Abb. 1. Das Verhalten des isolierten Enddarmes (Ratte) bei Einwirkung von 1,2,4-Butantriol. Zeit in Minuten. 50 cm³ Tyrode-Bad. Bei ↑ 1,2,4-Butantriol 1:75. Man beachte das spontane Wiederauftreten von Darmbewegungen.

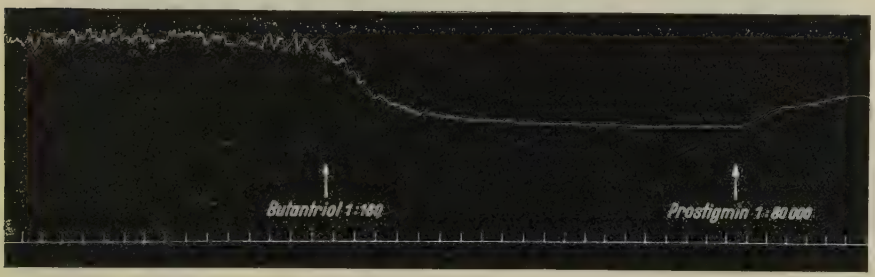


Abb. 2. Das Verhalten des isolierten Dünndarmes (Ratte) bei Einwirkung von 1,2,4-Butantriol. Zeit in Minuten. 40 cm³ Tyrode-Bad. Bei ↑₁ 1,2,4-Butantriol 1:160, bei ↑₂ Prostigmin 1:80000.

Der *isolierte Enddarm* (nach Magnus) wird durch 1,2,4-Butantriol in einer Konzentration von 1:40 weitgehend beruhigt. Die Darmbewegungen werden schwächer, und der Tonus fällt ab. Bei Verwendung schwächerer Konzentrationen (1:75 bis 1:300) folgt spontane Erholung und Neigung zu erhöhter Darmtätigkeit (Abb. 1). Die gleiche Wirkung hat auch Glyzerin.

Der Einfluß von 1,2,4-Butantriol auf den *isolierten Dünndarm* ist dadurch gekennzeichnet, daß eine Konzentration 1:800 wirkungslos bleibt, höhere Konzentrationen (1:400 bis 1:80) rufen eine starke Abnahme des Tonus hervor (Abb. 2). Die Pendelbewegungen bleiben zu-

nächst erhalten und erlöschen nur bei der Kontraktion 1:80 schließlich vollständig. Die Abnahme des Tonus und der Pendelbewegungen läßt sich durch entsprechende Gaben von Prostigmin aufheben. Die Wirkung des 1,2,4-Butantriol ist also der des Glyzerins, wie wir sie a. a. O.[4] in Übereinstimmung mit Schübel[6] beschrieben haben, ähnlich. Durch Auswaschen kann die Wirkung des Butantriol nicht rückgängig gemacht werden.

Am *isolierten Meerschweinchenuterus* — das Gewicht der Tiere betrug 150—200 g — bleiben selbst Butantriol-Konzentrationen von 1:100 ohne deutliche Wirkung, etwa vorhandene Bewegungen können beruhigt werden. Wird der isolierte Uterus durch Hypophysenhinterlappen-

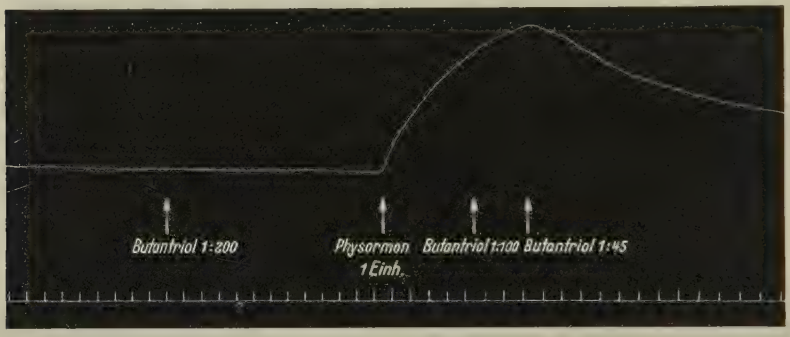


Abb. 3. Die Wirkung von 1,2,4-Butantriol auf den isolierten Meerschweinchenuterus. Zeit in Minuten. 40 cm³ Tyrode-Bad. Bei ↑1 1,2,4-Butantriol 1:200, bei ↑2 „Physormon" 1 V.E., bei ↑3 *und* 4 1,2,4-Butantriol (3 = 1:100; 4 = 1:45).

extrakt („Physormon", Promonta) zur Kontraktion gebracht, so läßt sich diese durch Zusatz von 1,2,4-Butantriol lösen. Die benötigte Menge Butantriol scheint dabei von der Menge des vorher zugesetzten Hypophysenhinterlappenextraktes abhängig zu sein. In niedrigen Konzentrationen ist 1,2,4-Butantriol auf den isolierten Meerschweinchenuterus wirkungslos (Abb. 3).

In kurzfristigen Versuchen haben wir auch den Einfluß von 1,2,4-Butantriol auf die zelluläre Zusammensetzung des *Blutes* untersucht. Dabei wurden je zwei Ratten für die Dauer von 4 Tagen 10,0 cm³ 1,2,4-Butantriol (unverdünnt) je kg Körpergewicht täglich mit der Schlundsonde verabreicht oder die halbe Menge subkutan injiziert. Die Hämoglobinbestimmung erfolgte nach Sahli, Erythrozyten- und Leukozytenzählung unter Verwendung der üblichen Pipetten in der Thoma-Zählkammer, der Differentialausstrich wurde nach Schilling ausgewertet. Das Blutbild vom 5. Tage zeigt bei den mit 1,2,4-Butantriol ebenso wie bei den mit Wasser gefütterten Tieren keine Änderung gegenüber den Befunden, welche vor Beginn der Fütterung erhoben waren (Tab. 4).

Tabelle 4. *Einfluß von 1,2,4-Butantriol und Wasser auf Hämoglobingehalt, Erythrozyten- und Leukozytenzahl des Blutes von Ratten bei oraler Zufuhr* (Dosis: 10,0 cm³ 1,2,4-Butantriol (unverdünnt) bzw. 10,0 cm³ Wasser/kg Körpergewicht).

Hämoglobin in %, Erythrozyten in Mill., Leukozyten in Tausend

Ratte Nr.		vor der Behandlung	am 5. Tage d. Behandlung	Ratte Nr.		vor der Behandlung	am 5. Tage d. Behandlung
		I. 1,2,4-Butantriol				II. Wasser	
2792	Hb.	98	97	2796	Hb.	92	88
	E.	8,00	8,18		E.	6,75	7,70
	L.	11,0	14,2		L.	10,2	15,6
2793	Hb.	81	88	2797	Hb.	86	82
	E.	6,38	6,72		E.	7,92	6,75
	L.	11,2	14,4		L.	12,2	17,6

Nach *subkutaner* Injektion von 1,2,4-Butantriol sind die Erythrozytenzahlen und die Hämoglobinwerte deutlich vermindert. Man kann daher annehmen, daß das Auftreten von rotem Farbstoff im Harn von Ratten mit dieser Abnahme in ursächlichem Zusammenhang steht. Als Reaktion auf diese Veränderungen treten im roten Blutbild Erscheinungen der Regeneration auf, d. h. Vermehrung der kernhaltigen Erythrozyten, verstärkte Anisozytose und Poikilozytose. Nach Injektion gleicher Mengen physiologischer Kochsalzlösung bleiben derartige Veränderungen aus (Tab. 5).

Tabelle 5. *Einfluß von 1,2,4-Butantriol und 0,9%iger Kochsalzlösung auf Hämoglobingehalt, Erythrozyten- und Leukozytenzahl des Blutes von Ratten bei subkutaner Zufuhr* (Dosis: 5,0 cm³ 1,2,4-Butantriol (unverdünnt) bzw. 5,0 cm³ physiologischer Kochsalzlösung/kg Körpergewicht).

Hämoglobin in %, Erythrozyten in Mill., Leukozyten in Tausend

Ratte Nr.		vor der Behandlung	am 5. Tage d. Behandlung	Ratte Nr.		vor der Behandlung	am 5. Tage d. Behandlung
		I. 1,2,4-Butantriol				II. 0,9%ige Kochsalzlösung	
3071	Hb.	102	75	3073	Hb.	97	89
	E.	7,12	5,01		E.	8,4	8,1
	L.	15,4	13,8		L.	15,0	12,0
3072	Hb.	85	69	3074	Hb.	80	78
	E.	7,44	5,21		E.	7,63	7,14
	L.	17,2	14,4		L.	16,2	19,0

Das Verhalten des Blutbildes von Ratten nach subkutaner Injektion von Glyzerin DAB VI ist in Tab. 6 dargestellt. Auch hier kommt es regelmäßig zu einer Hämoglobinurie und dementsprechend zum Absinken der Erythrozytenzahlen und der Hämoglobinwerte.

Tabelle 6. *Einfluß von Glyzerin auf Hämoglobingehalt, Erythrozyten- und Leukozytenzahl des Blutes von Ratten bei subkutaner Zufuhr* (Dosis: 5,0 cm³ Glyzerin DAB VI/kg Körpergewicht).

Hämoglobin in %, Erythrozyten in Mill., Leukozyten in Tausend			
Ratte Nr.		vor der Behandlung	am 5. Tage der Behandlung
3075	Hb.	72	66
	E.	7,03	6,19
	L.	13,4	14,0
3076	Hb.	83	62
	E.	7,19	5,78
	L.	19,8	24,0

Wie aus Tab. 7 zu entnehmen ist, steigt die Zahl der Retikulozyten — üblicherweise bezogen auf Tausend rote Blutkörperchen, Färbung nach Schilling — nach subkutaner Injektion von 1,2,4-Butantriol und Glyzerin DAB VI stark an. Bei den mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Tieren ist hingegen nur eine Erhöhung der Retikulozytenwerte bis zur oberen Grenze der Norm zu beobachten.

Tabelle 7. *Retikulozytenwerte nach subkutaner Zufuhr von 5,0 cm³ 1,2,4-Butantriol, 0,9%iger Kochsalzlösung oder Glyzerin DAB VI je kg Körpergewicht Ratte.*

Substanz	Retikulozytenzahl (Mittelwert von je 2 Tieren)	
	vor der Behandlung	am 5. Tage der Behandlung
1,2,4-Butantriol	2,5‰	80‰
0,9%ige Kochsalzlösung . . .	8‰	23‰
Glyzerin DAB VI	14‰	99‰

Das weiße Blutbild bietet in sämtlichen Untersuchungen keine Besonderheiten.

Die *hämolytische Wirkung* von 1,2,4-Butantriol wurde im Vergleich zu der von Glyzerin auch in vitro untersucht. Dabei beobachteten wir, daß 1,2,4-Butantriol in allen Versuchen nur wenig stärker hämolytisch wirkte als Glyzerin[3]. So setzte die Hämolyse z. B. in einer etwa 70%igen Lösung von 1,2,4-Butantriol schon nach wenigen Minuten ein, während über 1 Std verging, bis Glyzerin in derselben Konzentration den gleichen Effekt auslöste. Bei einem Gehalt der Lösungen von etwa 35% verursachte Butantriol nach 24 Std eine unvollständige Hämolyse; Glyzerin ließ zu diesem Zeitpunkt nur den Beginn einer Hämolyse erkennen. Dasselbe Ergebnis fanden wir im Prinzip bei allen von uns durchgeführten Hämolyseversuchen, gleichgültig, ob dabei menschliches Blut oder Blut von Ratten bzw. Katzen verwandt wurde. Allerdings scheint Tierblut etwas empfindlicher zu sein.

Die spektroskopische Untersuchung des Blutes auf *Methämoglobin* — Katze; 3 Tage je 0,5 cm³ 1,2,4-Butantriol/kg Körpergewicht (Schlund-

sonde), Blutentnahme am 4. Tage oder subkutane Injektion von 16,0 cm³/kg Körpergewicht, Blutentnahme nach 24 Std — war negativ.

V. Besprechung der Ergebnisse.

Wir haben in den vorstehenden Versuchen die Wirkungen eines dreiwertigen Alkohols mit 4 Kohlenstoffatomen (1,2,4-Butantriol) verglichen mit denen eines dreiwertigen Alkohols mit 3 Kohlenstoffatomen (1,2,3-Propantriol = Glyzerin). Jede dieser Verbindungen enthält 2mal die Gruppe CH_2OH der primären und 1mal die Gruppe CHOH der sekundären Alkohole; beide sind daher als diprimär-sekundäre Alkohole anzusprechen.

Die wichtigste Feststellung, die sich aus den vorliegenden Untersuchungen ableiten läßt, ist die Tatsache, daß bei Einführung einer Hydroxylgruppe in einen zweiwertigen Alkohol mit 4 Kohlenstoffatomen ein dreiwertiger Alkohol entsteht, der, obwohl kohlenstoffreicher als Glyzerin, dennoch dem Glyzerin eigene Eigenschaften zeigt, die den zweiwertigen Alkoholen mit 3 oder 4 Kohlenstoffatomen fehlen. So fällt zunächst auf, daß es nach subkutaner Injektion von dreiwertigen Alkoholen mit 3 oder mehr Kohlenstoffatomen (1,2,4-Butantriol und 1,2,3-Propantriol), nicht aber von zweiwertigen Alkoholen gleicher Kettenlänge (1,2-Propandiol, 1,2-Butandiol, 1,3-Butandiol, 1,4-Butandiol) zu einer Ausscheidung von Hämoglobin im Harn kommt. Nach orientierenden Versuchen scheint Glyzerin in vivo etwas stärker wirksam zu sein als Butantriol. Eine Hämoglobinurie kann man bei beiden Substanzen auch nach intravenöser Injektion (0,5—1,0 cm³ je Ratte) beobachten. Es darf in diesem Zusammenhange bemerkt werden, daß auch blutisotonische Lösungen von Glyzerin nach subkutaner Injektion (2,55%ige Glyzerinlösung in Wasser nach Schübel[6]) eine Hämoglobinurie verursachen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß der Effekt nicht nur mit der osmotischen Wirkung der wasseranziehenden Substanzen zusammenhängt.

1,2,4-Butantriol und Glyzerin DAB VI stimmen auch in ihrer Wirkung auf den Darm weitgehend überein. Beide Substanzen führen sowohl bei Hunden als auch bei Meerschweinchen und Ratten ab. Sie wirken selbst dann, wenn der Enddarm offenbar ohne Inhalt ist und der abzusetzende Kot aus höheren Dickdarmabschnitten herangeführt werden muß. Gröbere zeitliche Unterschiede hinsichtlich des Eintrittes und der Dauer der Wirkung ließen sich dabei nicht mit Sicherheit feststellen.

Obwohl der größte Teil des in den Darm eingeführten 1,2,4-Butantriol bzw. Glyzerins DAB VI mit dem Kote ausgestoßen wird, muß dahingestellt bleiben, ob der im Darm verbleibende Rest noch gesundheitsschädigende resorptive Wirkungen (z. B. Hämolyse) entfalten kann; ein Anhalt dafür läßt sich nach einmaliger Ausführung der Einläufe bei der Ratte nicht finden.

Auf den isolierten Enddarm wirken 1,2,4-Butantriol und Glyzerin ebenfalls gleichartig. Beide stellen in einer Konzentration 1 : 150 die Darmbewegungen ruhig und lassen ihn erschlaffen; spontan kommt es dann zur Rückbildung dieser Veränderungen mit gelegentlich verstärkter Darmmotorik.

Im Gegensatz zu den dreiwertigen zeigen die zweiwertigen Alkohole eine andere Wirkung auf den Enddarm. Hierüber haben wir an anderer Stelle[2] berichtet.

Die mittleren tödlichen Dosen von 1,2,4-Butantriol und wasserfreiem Glyzerin stimmen bei oraler Zufuhr nahezu überein. Subkutan injiziert wirkt 1,2,4-Butantriol bei der Maus weniger, bei der Ratte stärker toxisch als Glyzerin DAB VI. In bezug auf seine *akute* Toxizität ist also unverdünntes 1,2,4-Butantriol nicht giftiger als wasserfreies Glyzerin. Es sei hier noch erwähnt, daß die Giftigkeit von 1,2,4-Butantriol in verdünnten Lösungen geringer ist als dem Verdünnungsgrad entspricht (die 50%ige wäßrige Lösung hat z. B. bei der Maus eine LD 50 von über 50,0 cm^3/kg Körpergewicht).

Die Frage, ob der von uns angenommene Zusammenhang[4] zwischen der Qualität der Hydroxylgruppen in zweiwertigen Alkoholen und ihrer Toxizität auch für die dreiwertigen Alkohole zutrifft, kann erst nach Untersuchung anderer Vertreter dieser Gruppe entschieden werden.

Obwohl die mitgeteilten kurzfristigen Versuche keine Aussagen über die Resorption des 1,2,4-Butantriol, sein Schicksal im Organismus und die Art seiner Elimination zulassen, sei in diesem Zusammenhange jedoch die Beobachtung erwähnt, daß ein Hund (7,0 kg) eine einmalige orale Gabe von 1,0 cm^3/kg Körpergewicht unverdünntem 1,2,4-Butantriol reaktionslos vertrug, der Urin aber später eine deutlich positive Azetonprobe ergab. Eine Wiederholung des Versuches 14 Tage später lieferte das gleiche Ergebnis. Es wäre unseres Erachtens jedoch verfrüht, hieraus auf einen bestimmten Abbaumechanismus zu schließen.

VI. Zusammenfassung.

In vergleichenden Untersuchungen zeigten die dreiwertigen Alkohole 1,2,4-Butantriol und Glyzerin bei Mäusen, Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen, Katzen und Hunden eine auffallende Übereinstimmung ihrer akuten Wirkungen, sowohl der örtlichen als auch der resorptiven:

1. Die Toxizität beider Substanzen ist ungefähr gleich.
2. Reizwirkungen am Applikationsort fehlen.
3. Nur große intravenöse Gaben senken vorübergehend den Blutdruck der Versuchstiere und beschleunigen die Atmung.
4. Ihre Wirkung auf den Darm ist ähnlich.

5. Subkutan injiziert, verursachen beide Substanzen eine Hämoglobinurie mit entsprechenden Veränderungen des peripheren Blutes; dabei bleiben die Blutbildungsstätten offenbar ungeschädigt.

Die Frage, ob die wiederholte Zufuhr von 1,2,4-Butantriol ebenso reaktionslos vertragen wird wie die kurzfristige Anwendung in den bebeschriebenen Versuchen, muß zunächst offen bleiben.

Die Untersuchungen werden fortgesetzt.

Literatur.

[1] Beilsteins Handbuch der organischen Chemie, Bd. I, S. 519; Ergbd. I, S. 276. Springer-Verlag, Berlin 1918 bzw. 1928. — [2] Bornmann, G., R. Kopf u. G. Meyer: Z. f. exper. Med. im Druck. — [3] Bornmann, G.: Pharmazie, in Vorbereitung. — [4] Fischer, L., R. Kopf, A. Loeser u. G. Meyer: Z. f. exp. Med. **115**, 22 (1949). — [5] Reppe, W.: Neuere Entwicklungen auf dem Gebiete der Chemie des Acetylens und Kohlenoxyds, Experientia V/3 (1949), 93—110. — [6] Schübel, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 132 (1936).

A. Loeser, Münster i. Westf., Westring 12,
Pharmakologisches Institut der Universität.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 374—379 (1950).

Aus der Med. Univ.-Klinik Freiburg/Br.
(Direktor: Prof. Dr. L. Heilmeyer).

Adenosintriphosphorsäure als atmungssteigernder Faktor im menschlichen Serum.

Von

J. Pirwitz und E. Haaf.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. Januar 1950.)

Morawitz[1] hat 1909 beobachtet, daß retikulozytenreiches Blut stärker als Normalblut atmet. In früheren Veröffentlichungen[2, 3] haben wir beschrieben, daß, wenn man Serum aus retikulozytenreichem Blut mit Normalerythrozyten mischt, dieses Gemisch gleichfalls einen gesteigerten Sauerstoffverbrauch zeigt. Es wurde infolgedessen angenommen, daß zumindest ein Teil der Steigerung des Sauerstoffverbrauches auf Substanzen im Serum zu beziehen sei.

Wir verwerteten als Test die Steigerung der Atmung von 100 mg bei 37° bis zur Gewichtskonstanz getrockneter Erythrozyten durch hinzugefügtes Serum. Im Verlauf weiterer Untersuchungen stellte sich heraus, daß genau so gut wie Erythrozytenpulver unter denselben Bedingungen getrocknetes Muskelpulver verwendet werden könnte. Bei den im folgenden beschriebenen Versuchen sind jeweils 100 mg solchen Muskelpulvers mit 1 cm^3 Serum oder Flüssigkeit gemischt und im Warburg-apparat angesetzt worden. Die angegebenen Zahlen für den Sauerstoffverbrauch in Kubikmillimeter beziehen sich auf den nach der Formel $\frac{a + b/2}{2}$ ausgedrückten Mittelwert der Atmung, wobei a der Wert des O_2-Verbrauches der ersten, b der Wert der zweiten Stunde ist.

Wir versuchten, über die Natur des atmungssteigernden Faktors etwas auszusagen und stellten zunächst 15 Versuche mit Normalserum an. Die dabei erhaltenen Werte betrugen im Mittel 86 mm^3 O_2. Der höchste Wert lag bei 112, der tiefste bei 44 mm^3. Um den Zusammenhang mit der Retikulozytensteigerung im Blut sicherzustellen, wurden einem 3 kg schweren Kaninchen tgl. 20 cm^3 Blut abgenommen und davon Serum und Muskelpulver im oben angegebenen Verhältnis angesetzt. Gleichzeitig wurden Retikulozyten, Hämoglobin und Erythrozyten bestimmt. Die erhaltenen Werte stellt Abb. 1 dar.

Aus ihr geht hervor, daß zwischen Retikulozytenzahl des Blutes und atmungssteigernder Wirkung des daraus gewonnenen Serums ein relativ enger Parallelismus besteht.

Um die Natur des wirksamen Faktors zu bestimmen, gingen wir von der Vorstellung aus, daß das mit Brillantkresylblau darstellbare Retikulum in den jungen Erythrozyten aus Nukleoproteiden besteht, daß es sich mit Wahrscheinlichkeit also bei dem den O_2-Verbrauch steigernden Faktor um deren Abbauprodukte handele.

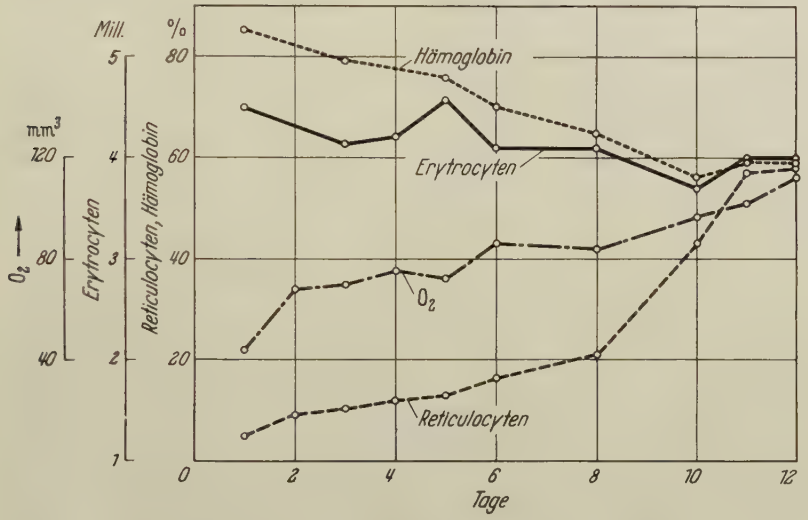


Abb. 1.

Wir dialysierten daher Serum in Cellophanschläuchen gegen die doppelte Menge Aqua dest. Um Bakterienwirkung auszuschließen, wurde das Dialysat vor dem Ansetzen im Warburg-Apparat fraktioniert sterilisiert*. Da die Außenflüssigkeit jeweils das Doppelte des Schlauchinhaltes betrug, muß der Faktor im weiter bearbeiteten Dialysat im Verhältnis 1:3 verdünnt worden sein. Wir setzten vom Dialysat stets 1 cm³ an und erhielten als Mittelwert einen Sauerstoffverbrauch von 74 mm³ (niedrigster Wert 40, höchster Wert 98 mm³). Muskelpulver und physiologische Kochsalzlösung zeigten einen Sauerstoffverbrauch von 6 mm³. Eine wesentliche Eigenatmung bestand also nicht. Gegen fließendes Wasser 24 Std lang dialysierter Schlauchinhalt und Muskelpulver verbrauchten 9 mm³ O_2. Damit war nachgewiesen, daß der gesuchte Faktor voll dialysabel ist.

Wir versuchten nun zu adsorbieren. Die Adsorption gelingt an Frankonit, Aluminiumhydroxyd von einem p_H von 7, Kalziumkarbonat,

* Herrn Prof. Dold danken wir ergebenst für wertvolle Ratschläge bei der fraktionierten Sterilisierung.

Bolus alba in saurem Milieu, an saurem und neutralem Kaolin. Die Elution gelang in keinem Falle. Angewandt wurden p_H-Änderungen, Äthyl-Urethan, Diammoniumphosphat, Azeton, Alkohol, Chloroform, Äther und NH_4OH.

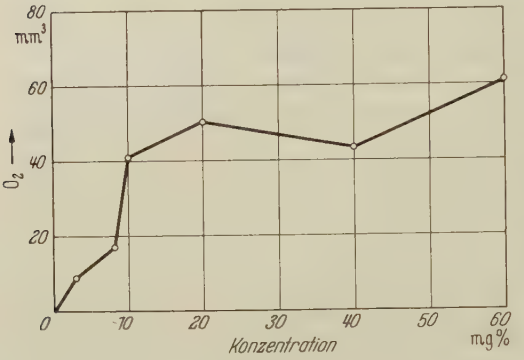


Abb. 2.

Es wurden nun Versuche angestellt, das Adsorptionsmittel nach der Adsorption chemisch zu zerstören: aus Alaun wurde mit Natronlauge $Al(OH)_3$ niedergeschlagen und der Faktor daran absorbiert. Nachdem der Niederschlag mit n/l HCl in $AlCl_3$ übergeführt worden war und sich vollständig löste, atmete die Lösung nicht mehr: der Faktor wurde offenbar zerstört. Aus dem gleichen Grunde schlug der analoge Versuch mit Kalziumkarbonat fehl. Da Adsorptionsversuche nicht zum Ziele führten, wurden verschiedene Schwermetallsalze als Fällungsmittel erprobt. Die fragliche Substanz erwies sich als mit Bleiacetat, Kupferbisulfit, Barium-Chlorid u. -Azetat fällbar. Die Niederschläge mit Muskelpulver zusammengebracht verbrauchten jeweils Sauerstoff, der Überstand nicht. Die Metallsalze allein mit Muskelpulver zusammengebracht bewirkten keine Atmung. Die Verbindung des Bleis mit dem Faktor war nichtlöslich. Trotzdem erfolgte Atmungssteigerung. Um das Bleisalz zu zerstören, leiteten wir H_2S durch dessen Aufschwemmung, um das Blei als Sulfid auszufällen. Der Niederschlag von PbS wurde verworfen, die überstehende Flüssigkeit atmete nicht. Offenbar wurde die Substanz an PbS adsorbiert, denn die Auf-

Abb. 3.

schwemmung von PbS und Faktor atmete stark. Mit H_2O_2 versuchten wir das PbS zum Sulfat zu oxydieren und in Aufschwemmung zu prüfen. Dabei ging die atmungssteigernde Wirkung verloren. Da auch andere Oxydationsmittel, wie Kalium-Permanganat, die Substanz zerstören, muß angenommen werden, daß sie ganz allgemein durch stärkere Oxydationsmittel zerstört wird.

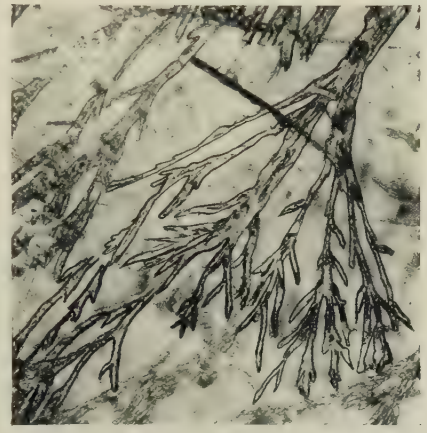


Abb. 4.

Da Kupferbisulfit nach Hinsberg[4] ein spezifisches Fällungsmittel für Purine und ihre Verbindungen ist, setzten wir, um Purinbasen auszuschließen, Adenin und Guanin in Lösung zum Muskelpulver. Es erfolgte keine Atmung. Xanthin und Hypoxyanthin schlossen wir dadurch aus, daß wir uns aus frischer Milch durch Ausfällen mit Ammonsulfat, Ätherextraktion und schonendes Trocknen Xanthinoxydase herstellten[5] und sie auf unser Dialysat einwirken ließen, so daß Xanthin und Hypoxanthin zur Harnsäure oxydiert werden mußten, die selbst keine Wirkung zeigte. Der atmungssteigernde Faktor im Dialysat blieb erhalten.

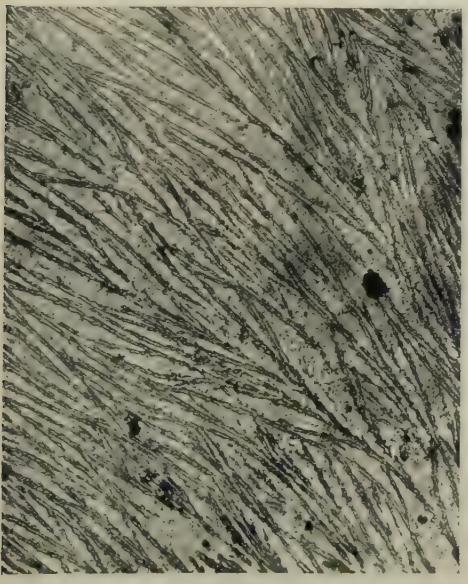


Abb. 5.

Wenn wir bei der Annahme eines Nukleoproteidabkömmlings blieben, war zu erwarten, daß nicht Purinbasen, sondern Nukleoside oder Nukleotide vorlägen.

Da nach den Atmungsversuchen wahrscheinlich war, daß die fragliche Substanz fermentativ bei dem Muskelstoffwechsel beteiligt sei, wandten wir in ihrer Wirkung bekannte Hemmkörper verschiedener Glykolysestufen an: Phloridzin in einer Konzentration von 5 mg% steigerte die Atmung leicht. Natrium-

fluorid (0,5 mg%) steigerte die Atmung um mehr als das Doppelte. Monojod-Essigsäure (2,5 mg%) hemmte sie vollständig. Nach diesen Befunden nahmen wir an, daß die Steigerung durch Natriumfluorid so zustande käme, daß sich durch die Hemmung des fraglichen Fermentes Substrat anreichere, und daß durch Phloridzin der Abbau der ATP zu Adenylsäure gehemmt würde (Adenylsäure steigerte die Atmung um etwa 40% weniger als ATP). Es war demnach wahrscheinlich, daß es sich um Adenosintriphosphorsäure handelte. Wir setzten nun ATP* in Konzentration von 2 mg% zu. Es erfolgte eine deutliche Atmungssteigerung.

Abb. 6.

Die Abhängigkeit der Atmungssteigerung von der Konzentration ist auf beigefügter Abb. 2 dargestellt.

Aus ihr geht hervor, daß die atmungssteigernde Wirkung der ATP zwischen Konzentrationen von 1—20 mg% etwa parallel der Konzentration geht, daß aber durch höhere ATP-Zusätze keine weitere Atmungssteigerung mehr erreicht wird. Es ist danach anzunehmen, daß die normalen ATP-Werte im Serum zwischen 1 und 20 mg% liegen. Unser Testverfahren ist jedoch noch zu ungenau, um verläßliche und exakte quantitative Angaben zu liefern.

Es schien möglich, daß die zugesetzte ATP in Anwesenheit von Muskelpulver zur Adenylsäure abgebaut würde[6]. Wir stellten infolgedessen Adenylsäure aus dem oben erwähnten Präparat her, indem wir es mit Bariumhydroxyd bei einem p_H von 8 sieben min lang kochten, und stellten fest, daß auch Adenylsäure eine deutliche Atmungssteigerung bewirkt.

Um die Entscheidung zu erhalten, ob es sich bei dem gesuchten Faktor um Adenylsäure oder ATP handelt, wurde er in sein Natriumsalz überführt[7] und ein Tropfen der Lösung auf einem Objektträger angetrocknet. Die dabei erhaltenen Kristalle stellt Abb. 3 dar. Abb. 4 zeigt Kristalle des Natriumsalzes reiner ATP, Abb. 5 solche reiner Adenylsäure. Abb. 6 stellt Kristalle von einem Gemisch reiner Adenylsäure mit reiner ATP dar.

* Wir verwendeten das Präparat Triadenyl, das uns freundlicherweise von der Firma Henning, Hamburg, zur Verfügung gestellt wurde.

Aus ihnen geht hervor, daß es sich bei dem fraglichen Faktor fast vorwiegend um ATP handelt, der vielleicht kleine Mengen Adenylsäure beigemischt sind.

Zusammenfassung.

Es wird die Darstellung des früher beschriebenen, die Erythrozytenatmung steigernden Faktors aus menschlichem Serum beschrieben. Er erweist sich als Adenosintriphosphorsäure, der vielleicht kleine Mengen von Adenylsäure beigemischt sind.

Literatur.

[1] Morawitz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **60**, 298 (1909). — [2] Pirwitz: Klin. Wschr. **1947**, 263—265. — [3] Pirwitz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 594 (1949). — [4] Hinsberg, K., u. K. Lang: Medizinische Chemie, Berlin 1938, S. 393. — [5] Hinsberg, K., u. K. Lang: Medizinische Chemie, Berlin 1938, S. 399. — [6] Lohmann u. Schuster: Biochem. Z. **272**, 24 (1934). — [7] Parnas u. Lutwak-Mann: Biochem. Z. **278**, 11 (1935).

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 380—388 (1950).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Vorstand: Prof. Dr. F. Eichholtz).

Über die Dehydrasen-hemmende Wirkung von Bienengift*.

Von

A. Fleckenstein, H. Tippelt und H. Kroner.

(Eingegangen am 28. Dezember 1949.)

Über die Wirkung des Bienengifts auf den desmolytischen Stoffabbau war bislang nichts bekannt. Bei der systematischen Prüfung der Angriffspunkte von schmerz- und entzündungserregenden Substanzen im Zellstoffwechsel (Fleckenstein[1]) wurde jedoch neuerdings gefunden, daß Bienengift noch in minimaler Konzentration Dehydrierungsprozesse blockiert. Bienengift ruft damit die gleichen spezifischen Ferment-Hemmungen hervor, die auch für die wichtigsten halogenhaltigen und halogenfreien Schmerz- und Entzündungsgifte von bekannter chemischer Konstitution charakteristisch sind. Die im folgenden wiedergegebenen Untersuchungen sollten unsere bisherigen Befunde erweitern; es wurde dabei besonders geprüft

a) ob außer der zuerst verwendeten Rattenmuskulatur auch Froschmuskelbrei durch Bienengift in seinem Dehydrierungsvermögen beeinträchtigt wird,

b) ob die ursprünglich mit der Thunberg-Methode festgestellten Hemmungen auch bei Verwendung von Triphenyltetrazoliumchlorid als Wasserstoff-Akzeptor (Kuhn u. Mitarbeiter[2]) in gleicher Stärke hervortreten.

Experimenteller Teil.

Methode.

Zubereitung des Muskelpräparats: Die frische Muskulatur von jeweils 2—4 Esculenten (Tötung durch Dekapitation) wurde 3mal durch eine kleine Fleischmamaschine gedreht und daraus ein feiner Brei gewonnen; dieser wurde anschließend für die Versuche mit Citronensäure, Milchsäure, Brenztraubensäure 2mal je 3 min in je 90 cm³ Natriumphosphat-Pufferlösung (1 Teil 0,2 mol prim. Natriumphosphat + 2 Teile 0,2 mol sek. Natriumphosphat) unter dauerndem Umrühren gewaschen

* Ein vorläufiger Bericht über die Bienengiftwirkungen auf die Dehydrierung von Pyruvat, Zitrat, Succinat, Oxalazetat (untersucht mit der Thunberg- sowie mit der Triphenyltetrazoliumchlorid-Methode) wurde am 5. Juli 1949 als Diskussionsbemerkung zu einem Vortrag von Prof. Lettré im Naturhist.-med. Verein Heidelberg gegeben; die hemmende Wirkung auf die Milchsäuredehydrase wurde schon vorher[1] mitgeteilt.

(6maliges Waschen für die Versuche mit Bernsteinsäure und Glyzerinphosphorsäure). Zum Abpressen der Pufferlösung nach dem Waschen diente jeweils ein feinmaschiges Leinentuch. Sehnenreste und gröbere, noch nicht völlig zermahlene Muskelteilchen wurden entfernt.

Vergiftung des Muskelbreies: Zur Vergiftung wurde getrocknetes Bienengift der Firma Mack & Co., Illertissen (Charge 2/48) verwendet. Bei weißen Mäusen von zirka 20 g sind von dieser Charge 4 mg/100 g intra-peritonal verabreicht tödlich. In die THUNBERG-Röhrchen kam jeweils 1 g Muskelpräparat + 2,5 cm³ Phosphat-Pufferlösung + Bienengift (in diesem Phosphat-Puffer in der gewünschten Konzentration gelöst).

Versuche mit Methylenblau: Nach 1 Std Stehen bei Zimmer-Temperatur wurde in jedes Röhrchen noch 0,5 cm³ Phosphat-Puffer + 1 cm³ 0,2 mol der zu prüfenden Substrate (Bernsteinsäure, Zitronensäure, Milchsäure, Brenztraubensäure, Glyzerin-Phosphorsäure als Natrium-Salz) in Phosphat-Puffer + 1 cm³ Methylenblau-Lösung 1:2000 in Phosphat-Puffer zugegeben. Dadurch wird die während der 1stündigen Vorvergiftung bestehende Konzentration an Bienengift auf die Hälfte erniedrigt; unsere Konzentrations-Angaben beziehen sich jeweils auf die Endkonzentrationen. Die giftfreien Kontrollen waren in entsprechender Weise angesetzt. Weitere Kontrollen ohne und mit Giftzusatz enthielten an Stelle von 1 cm³ Substratlösung 1 cm³ reinen Phosphat-Puffer, um die Methylenblau-Entfärbung der Muskelpräparate an sich sowie die Hemmung dieser Eigen-Entfärbung durch Bienengift festzustellen. Die Röhrchen wurden mit reinem Stickstoff bzw. mit Leuchtgas gefüllt und die Entfärbungs-Zeiten im Wasserbad bei 30° bestimmt. Um bessere Vergleiche zu ermöglichen wurden aus den Entfärbungs-Zeiten die prozentualen Dehydrierungshemmungen für die einzelnen Bienengift-Konzentrationen annäherungsweise berechnet.

Versuche mit Triphenyltetrazoliumchlorid: Bei den Versuchen mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) wurde an Stelle von 1 cm³ Methylenblau-Lösung 1 cm³ TTC-Lösung 1:200 in Phosphat-Puffer verwendet. Obwohl TTC auch bei Gegenwart von Sauerstoff als Wasserstoff-Akzeptor fungiert, zogen wir es vor, auch hierbei die Röhrchen mit Stickstoff bzw. mit Leuchtgas zu füllen. Anschließend wurden die Röhrchen in ein Wasserbad von 30° für 1—3½ Std gebracht, bis in den giftfreien Kontrollen eine stärkere Rotfärbung durch das — bei der Reduktion von TTC gebildete — Triphenylformazan eingetreten war. Da stärkere Licht-Einwirkung bei alkalischer Reaktion ebenfalls Rotfärbung durch Bildung von Triphenylformazan verursachen kann (vgl. WEYGAND u. FRANK[3]), erfolgten die Versuche, um jede Störungsmöglichkeit auszuschließen, bei gedämpftem Tageslicht.

Zu Ende des Versuchs wurde das gebildete Triphenylformazan mit Methylalkohol (45 cm³ je Röhrchen) 10 min lang ausgeschüttelt. Nach Absetzen der Muskelbestandteile (5 min) wurde die überstehende Flüssigkeit abgegossen und noch 5 min lang bei 3500 Umdr./min zentrifugiert. Die Bestimmung des in der klaren Flüssigkeit enthaltenen Triphenylformazan erfolgte mit dem Stufenphotometer bei einer Schichtdicke von 3 cm und Filter S 53. Die Eichkurve wurde mit Triphenylformazan* — gelöst in 1 Teil Phosphat-Puffer + 9 Teile Methylalkohol — nach Abzentrifugieren des Niederschlages festgelegt.

Die dehydrasen-hemmende Wirkung des Bienengifts wurde auch an Ratten-Muskulatur unter Verwendung von Methylenblau und TTC mit der gleichen Methodik wie an Frosch-Muskulatur geprüft.

---

* Für die freundliche Überlassung von Triphenyltetrazoliumchlorid und Triphenylformazan sind wir Herrn Prof. R. KUHN und Herrn Dr. MÖLLER vom Kaiser-Wilhelm-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg, sehr zu Dank verpflichtet.

I. Die Hemmung der Froschmuskel-Dehydrasen durch Bienengift nach Versuchen mit der Thunberg-*Methode.*

Ausgewaschener, an Substrat verarmter Muskelbrei führt bekanntlich nach Thunberg[4] bei Zusatz dehydrierbarer Substrate (Laktat, Pyruvat, Zitrat, Succinat[6], Oxalazetat usw.) rasch zu einer Methylenblau-Entfärbung (Hydrierung zu Leuko-Methylenblau bei O_2-Abschluß). Auch die von uns verwendeten Präparate aus Eskulenten-Muskeln zeigten im Thunberg-Versuch bei Substrat-Zusatz regelmäßig eine gute Dehydrasen-Aktivität: Laktat, Pyruvat, Zitrat und Oxalazetat wurden in unserem 2mal gewaschenen* Muskelbrei annähernd gleich gut als H-Donator verwertet.

Tabelle 1. *Hemmung der Muskel-Dehydrasen durch Bienengift in verschiedenen Konzentrationen.*

(Versuche mit der Thunberg-Methode an Froschmuskulatur [Sommerfrösche].)

	1:10000	1:20000	1:40000	1:80000	1:160000	1:320000	1:640000	1:1280000
Milchsäure-Dehydrierung	71%	70%	53%	63%	63%	52%	hemmende Grenzkonz. 1:1280000	
Brenztraubensäure-Dehydrierung	>90%	>90%	>90%	79%	72%	62%	24%	18%
Zitronensäure-Dehydrierung	93%	91%	69%	50%	20%	0%	—	—
Bernsteinsäure-Dehydrierung	etwa 15—20% Hemmung bis Konz. 1:320000						—	—
Oxalessigsäure-Dehydrierung	hemmende Grenzkonzentration 1:320000						—	—

Spuren von Bienengift sind nun imstande, diese Dehydrierungs-Prozesse im Froschmuskelbrei weitgehend zu hemmen (vgl. Tab. 1). Die Dehydrasen im Muskelbrei von Fröschen sind demnach gegenüber Bienengift ebenso empfindlich wie Ratten-Muskulatur. Besonders auffällig ist, daß die hemmenden Bienengift-Grenzkonzentrationen für die einzelnen Dehydrasen bei der Frosch- und Ratten-Muskulatur im Methylenblau-Versuch übereinstimmen: Auch an Ratten-Muskulatur wurde z. B. für

* Weiteres Auswaschen würde außer den noch vorhandenen, restlichen Substraten auch die Co-Fermente (Cozymase I bzw. II, gelbe Fermente) entfernen, die für diese Dehydrierungen nötig sind. Nur bei der Bernsteinsäure- und Glyzerophosphat-Dehydrase kann öfter ausgewaschen werden, da diese offenbar ohne Co-Fermente arbeiten (vgl. v. Euler[6]).

die Milchsäure- und Brenztraubensäure-Dehydrierung als noch hemmende Grenzkonzentration 1:1280000 ermittelt. Im Rattenmuskel-Brei war die Bienengift-Grenzkonzentration für die Hemmung des Zitronensäure-Abbaus wie bei Fröschen etwa 1:160000. Auch leichte Hemmungen des Bernsteinsäure-Abbaus (nicht mehr als 20%) ließen sich hier noch bis Konz. 1:320000 nachweisen.

Nach diesen Ergebnissen mit der THUNBERG-Methode könnte es den Anschein haben, daß die Milchsäure- und Brenztraubensäure-Dehydrierung durch Bienengift bedeutend stärker geschädigt wird als die Zitronensäure- und Bernsteinsäure-Dehydrase; die folgenden Untersuchungen mit TTC haben jedoch in dieser Hinsicht zu anderen Ergebnissen geführt.

II. Die Hemmung der Froschmuskel-Dehydrasen durch Bienengift nach Versuchen mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC).

Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) — von KUHN u. Mitarbeitern[2] sowie später von anderen Autoren[5] in seiner Verwendbarkeit als Wasserstoff-Akzeptor eingehend geprüft — setzt sich bei der Hydrierung zu dem roten Triphenylformazan um. Ein großer Vorteil gegenüber der

Tabelle 2. *Hemmung der Zitronensäure-Dehydrierung durch Bienengift in verschiedenen Konzentrationen*.*

(Bildung von Triphenylformazan in γ/1 g Froschmuskel-Brei.)

Versuchsreihe Nr.	Unvergiftete Kontrollen mit Substrat (Mittel)	Unvergiftete Kontrollen ohne Substrat (Mittel)	1:10000	1:20000	1:40000	1:80000	1:100000	1:200000	1:400000	1:800000	Versuchsdauer Min. nach TTC-Zusatz
1	147,5	25,0	15	40	15	30	35	45	50	55	120
	Hemmung %		*89,9*	*72,8*	*89,8*	*79,7*	*76,3*	*69,5*	*66,1*	*62,7*	—
2	162,5	65,0	40	40	50	60	75	70	90	120	60
	Hemmung %		*75,4*	*75,4*	*69,2*	*63,1*	*53,8*	*56,9*	*44,6*	*26,2*	—
3	162,5	27,5	35	30	35	40	60	70	90	120	90
	Hemmung %		*78,5*	*81,5*	*78,5*	*75,4*	*63,1*	*56,9*	*44,6*	*26,2*	—
4	132,5	10,0	55	45	40	40	50	60	110	120	90
	Hemmung %		*58,5*	*66,1*	*69,8*	*69,8*	*62,3*	*54,7*	*17,0*	*9,5*	—
5	325	35,0	55	55	65	85	145	170	225	265	120
	Hemmung %		*83,1*	*83,1*	*80,0*	*73,9*	*55,4*	*47,7*	*30,8*	*18,5*	—
	Endergebnis Hemmung %		*77*	*76*	*77*	*72*	*62*	*57*	*41*	*29*	

* Die Konzentrationsangaben für Bienengift beziehen sich in allen Fällen auf die Endkonzentrationen.

Verwendung von Methylenblau liegt in dem Umstand, daß das einmal gebildete Triphenylformazan luftbeständig ist und in Lösungsmitteln (in unseren Versuchen Methylalkohol) extrahiert und dann kolorimetrisch bestimmt werden kann. Während die Ablesung der Entfärbungs-Zeiten von Methylenblau immer etwas subjektiv ist, läßt sich bei Verwendung von TTC das gefärbte Hydrierungsprodukt einwandfrei erfassen; dadurch wird ein exakteres Arbeiten möglich.

Tabelle 3. *Endergebnisse*.*

Hemmung der Dehydrierung von Zitronensäure, Milchsäure, Brenztraubensäure, Bernsteinsäure und Glyzerinphosphorsäure durch Bienengift in verschiedenen Konzentrationen.

(Hemmung der Triphenylformazan-Bildung.)

	1:10000	1:20000	1:40000	1:80000	1:100000	1:200000	1:400000	1:800000
Zitronensäure-Dehydrierung Hemmung %	77	76	77	72	62	56	41	29
Milchsäure-Dehydrierung Hemmung %	78	75	69	68	58	54	41	28
Brenztraubensäure-Dehydrierung Hemmung %	66	58	56	57	50	41	35	11
Bernsteinsäure-Dehydrierung Hemmung %	69	58	39	42	38	37	33	29
Glyzerinphosphors.-Dehydrierung Hemmung %	38	27	30	16	20	17	7	13

* Der mittlere Fehler der hier wiedergegebenen Mittelwerte ist kleiner als $\pm 10\%$; im Falle der Glyzerinphosphorsäure-Dehydrierung halten wir die Anzahl der Versuche zur Sicherung der Fermenthemmung in den Konzentrationen 1:80000 bis 1:800000 nicht für ausreichend.

Auch in den Versuchen mit TTC treten die außerordentlich starken Hemmungseffekte von Bienengift — besonders auf die Dehydrierung von Brenztraubensäure, Milchsäure, Zitronensäure** und Bernsteinsäure klar hervor. Die Glyzerophosphat-Dehydrase wird ebenfalls — wenn auch nur schwach — geschädigt. Die Ergebnisse bei der Zitronensäure-Dehydrierung sind in Tabelle 2 als Beispiel für unser Verfahren in extenso wiedergegeben. Die nach dem gleichen Verfahren wie auf Tab. 2 (aus jeweils 5 Versuchsreihen) ermittelten Endergebnisse für die Hemmung

** Zitronensäure führt bei unseren Muskelpräparaten zu einer deutlich rascheren Bildung von Triphenylformazan als die anderen Substrate; Zitronensäure wird bei dieser Versuchsanordnung offenbar besonders schnell verwertet.

der Dehydrierung von Milchsäure, Brenztraubensäure, Zitronensäure, Bernsteinsäure und Glyzerinphosphorsäure sind in Tab. 3 zusammengestellt.

Eine besonders gute Übereinstimmung zwischen den mit TTC und den mit Methylenblau festgestellten Hemmungen ergab sich bei der Blockierung des Milchsäure- und Brenztraubensäure-Abbaus: Hier lassen beide Methoden fast die gleichen Hemmungs-Intensitäten bei den verschiedenen Bienengift-Konzentrationen erkennen; die gerade noch wirksame Bienengift-Grenzkonzentration ist in den TTC-Versuchen etwa 1:1 Million.

Eine größere Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der TTC-Methode und den Thunberg-Versuchen ergab sich hinsichtlich der Blockierung der Zitronensäure-Dehydrierung: Während Methylenblau schon bei Konz. 1:320000 keine Beeinträchtigung der Citrico-Dehydrase mehr anzeigte, trat die Hemmung der Zitronensäure-Dehydrierung im TTC-Versuch bedeutend stärker hervor; in Konz. 1:1 Mill. und darüber waren noch gewisse Hemmungen nachweisbar, die letzten Verzögerungen wurden (nicht ganz konstant) bei Konz. 1:2 Mill. gesehen. In ähnlicher Weise war auch die Beeinträchtigung der Succino-Dehydrase im TTC-Versuch besser nachweisbar als bei Verwendung von Methylenblau: Die Thunberg-Methode ergab selbst bei sehr starken Bienengift-Konzentrationen kaum Hemmungen über 20%; dagegen zeigte TTC bei der Bienengift-Konzentration 1:10000 fast 70% Hemmung des Bernsteinsäure-Abbaus an und ließ auch noch bei Konz. 1:800000 Effekte erkennen.

III. Die Beeinflussung der Zellatmung durch Bienengift.

An intakter Frosch-Muskulatur (Bauchdecken von Esculenten) und an Froschhaut schädigt Bienengift weit weniger die Zellatmung, als man nach der Dehydrasen-Hemmung im Muskelbrei erwarten sollte. Eine Erklärung hierfür liegt vermutlich in dem Umstand, daß das für unsere Atmungsbestimmungen verwendete Gewebe unbeschädigt ist, während im Muskelbrei nur schwer beschädigtes bzw. zerstörtes Gewebe zur Verwendung kommt: Intakte Zellen scheinen für Bienengift — vielleicht infolge eines erschwerten Eindringens — weniger angreifbar zu sein.

Die Atmung von Bäckerhefe (Pfälzische Preßhefen- und Spritfabrik Ludwigshafen) wird nach unseren Versuchen durch Bienengift erst in relativ starken Konzentrationen gehemmt.

Nach 1 Std Einwirkung von Bienengift wurde im Konzentrationsbereich 1:2000 bis 1:4000 70—90% Hemmung der Atmung beobachtet. Bei Konz. 1:10000 trat noch eine etwa 50%ige Hemmung des Sauerstoff-Verbrauchs ein. Konzentration 1:20000 verursachte meist nur noch geringfügige Hemmungen (zirka 10%). In noch stärkeren Verdünnungen kamen Atmungssteigerungen vor.

Das Warburgsche Atmungsferment (Cytochromoxydase, Indophenoloxydase) wird durch Bienengift nicht beeinträchtigt; denn die Oxydation von p-Phenylendiamin, die durch dieses eisenhaltige Ferment vollzogen wird, verläuft auch noch nach Einwirkung starker Konzen-

trationen von Bienengift (1:2000) im Muskelbrei ungestört. Im ganzen gesehen hat sich ein klares Bild über die Beeinflussung der Oxydationen an der *intakten* Zelle durch Bienengift aus unseren bisherigen Versuchen noch nicht ergeben; hierzu sind noch weitere Studien nötig.

Besprechung.

Die vorliegenden Versuche zeigen, daß Bienengift bei Einwirkung auf Muskelbrei die dort ablaufenden Dehydrierungen noch stärker hemmt als die anderen schmerz- und entzündungserregenden Substanzen, die von uns bisher in dieser Beziehung geprüft worden sind. Während diese Gifte von bekannter chemischer Konstitution (Ester der Monohalogenessigsäuren, halogenhaltige aromatische und aliphatische Ketone, Halogenzyane, Allylsenföl, Akrolein usw.) im Muskelbrei bei Konz. 1:100000 meist keine stärkeren Dehydrierungs-Hemmungen[1] mehr verursachen, ist Bienengift bis zu einer millionenfachen Verdünnung wirksam. Bienengift greift dabei offenbar an denselben Stellen im desmolytischen Stoffabbau an wie diese anderen entzündungserregenden Substanzen, d. h. an der Milchsäuredehydrase und an den Dehydrasen des Zitronensäure-Zyklus (Brenztraubensäure-, Zitronensäure-, Bernsteinsäure-, Oxalessigsäure-Dehydrase). Die Glyzerophosphat-Dehydrierung wird weniger betroffen. *Diese Übereinstimmung in den Angriffspunkten des Bienengiftes und der anderen Entzündungsgifte weist erneut darauf hin, daß für die Schmerz- und Entzündungs-Wirkung spezifische, gut definierbare Fermenthemmungen (hauptsächlich im wasserstoffaktivierenden Anteil des oxydativen Stoffwechsels) entscheidend sind (vgl.* Fleckenstein[1]). Bienengift-Charge 2/48 ist bei intracutaner Injektion im Quaddelversuch noch bis Konz. 1:1—2 Millionen geringgradig entzündungserregend, d. h. macht eine lokale Hyperämie. Die entzündungserregende Grenzkonzentration fällt also praktisch wieder mit der dehydrasen-hemmenden Grenzkonzentration im Muskelbrei zusammen. Schmerzeffekte treten allerdings erst bei etwas stärkeren Konzentrationen ein. Es ist schon an anderer Stelle[1] die Möglichkeit erörtert worden, daß die Hemmung im Abbau dieser Säuren für die Schmerzentstehung von Bedeutung sein könnte; denn Zitronensäure, Brenztraubensäure und Oxalessigsäure sind selbst noch nach Neutralisation (als Na-Salze) bei intrakutaner Injektion stark schmerzerregend. Bei Anhäufung im Gewebe könnten sie u. U. als „chemisches Zwischenglied" bei der Schmerzentstehung im Sinne v. Freys eine Rolle spielen.

Trägt man die prozentualen Hemmungen der einzelnen Dehydrasen in Abhängigkeit von der Bienengift-Konzentration auf, so ergibt sich, daß sich die Hemmungen nicht in linearer Abhängigkeit von der einwirkenden Konzentration entwickeln, sondern im kurvenmäßigen Verlauf an eine Adsorptions-Isotherme erinnern: Spuren von Bienengift haben zunächst eine relativ starke Einschränkung der Dehydrasen-Aktivität zur Folge, während mit steigender Konzentration die

Zunahme der Hemmungen immer geringfügiger wird; selbst bei Konz. 1:10000 wurde in den Versuchen mit TTC 80% Hemmung nicht überschritten. Diese Konzentrationsabhängigkeit der Dehydrierungs-Hemmungen tritt im Prinzip auch in den Versuchen mit Methylenblau deutlich hervor. Trotz der bereits erwähnten Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der THUNBERG- und der Triphenyltetrazoliumchlorid-Methode ergeben beide Verfahren in gegenseitiger Ergänzung ein gutes Bild über die Angriffspunkte des Bienengiftes im Zellstoffwechsel. Präzisere Vorstellungen über die Natur der chemischen Reaktionen zwischen Bienengift und Ferment sind zur Zeit jedoch noch nicht möglich.

Nach neuen Untersuchungen (FLECKENSTEIN u. BERG) schädigen auch Schlangengifte (Toxin von Ammodytes ammodytes [Sandviper], Naja flava und Naja naja [Cobra]) die Dehydrierungsprozesse im Froschmuskel-Brei außerordentlich stark; die vollen Fermenthemmungen entwickeln sich jedoch bei diesen Toxinen — im Gegensatz zu dem rasch wirkenden Bienengift — erst nach stundenlanger Inkubation. Hierüber wird noch näher berichtet.

Zusammenfassung.

1. Bienengift beeinträchtigt die im Muskelbrei von Fröschen und Ratten ablaufenden Dehydrierungs-Prozesse bis in außerordentlich hohe, teilweise millionenfache Verdünnungen. Bienengift ist in dieser Versuchsanordnung das stärkste bisher bekannte Dehydrasengift. Dabei wird die anaerobe Umsetzung von Milchsäure, Brenztraubensäure, Zitronensäure, Bernsteinsäure, Oxalessigsäure, Glyzerinphosphorsäure betroffen.

2. Die Bestimmung der Dehydrasenhemmung erfolgte sowohl mit der THUNBERG-Methode als auch unter Verwendung von Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). In den Methylenblau-Versuchen wurden die prozentualen Hemmungen annäherungsweise aus den Entfärbungszeiten berechnet; in den Versuchen mit TTC wurde das rote, an Luft beständige Hydrierungsprodukt Triphenylformazan nach Ausschütteln mit Methyl-Alkohol direkt bestimmt.

3. Die Aktivität des WARBURGschen Atmungsferments (Cytochrom-Oxydase, Indophenol-Oxydase) wird durch Bienengift offenbar nicht herabgesetzt; denn die Oxydation von p-Phenylendiamin verläuft auch bei Einwirkung starker Konzentrationen von Bienengift ungestört.

4. Bienengift läßt damit die gleichen Angriffspunkte im desmolytischen Stoffabbau erkennen, wie die wichtigsten — schon in vorausgegangenen Untersuchungen geprüften — schmerz- und entzündungserregenden Zellgifte von bekannter chemischer Konstitution.

Für die freundliche Überlassung von Bienengift sind wir Herrn Dr. K. A. FORSTER, Fa. Mack, Illertissen, sehr zu Dank verpflichtet.

Literatur.

[1] Fleckenstein, A.: Verh. Dtsch. Pharmakolog. Ges. 16. Tagung Düsseldorf, September 1948, s. Arch. exper. Path. u. Pharm. **208**, 189 (1949). Die periphere Schmerzauslösung und Schmerzausschaltung, eine pharmakologische Analyse der Kausalmechanismen. Dr. Dietrich Steinkopff, Frankfurt 1949. Vergl. auch Naturforsch. u. Medizin in Deutschl. 1939–1946, Bd. 63 Pharmakologie u. Toxikologie Teil III, S. 147—153. — [2] Kuhn, R., u. D. Jerchel: Ber. Dtsch. Chem. Ges. **74**, 941, 949 (1941). Jerchel, D., u. W. Möhle: Ber. Dtsch. Chem. Ges. **77**, 591 (1944). — [3] Weygand, F., u. I. Frank: Z. f. Naturforsch. **3**b, 377 (1948). — [4] Thunberg, Th.: In Abderhalden: Handbuch der biol. Arbeitsmethoden Abt. IV/2, 2296. — [5] Mattson, A. M., C. O. Jensen, u. R. A. Dutcher: Science **106**, 294 (1947). Straus, F. H., N. D. Cheronis, u. E. Straus: Science (N. Y.) **108**, 113 (1948). Waugh, Th. D.: Science (N. Y.) **107**, 275 (1948). Kun, E., u. L. G. Abood: Science (N. Y.) **109**, 144 (1949). Doerr, W., u. E. v. Lüttichau: Klin. Wschr. **27**, 754 (1949). — [6] v. Euler, H.: Chemie der Enzyme, II. Teil, 3. Abschnitt, Bergmann, München 1934.

Dozent Dr. A. Fleckenstein, Heidelberg, Pharmakologisches Institut der Universität Heidelberg.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 389—392 (1950).

Aus dem Veterinär-Physiologischen Institut der Universität Leipzig.

Über die Wirkung insektizider Stoffe auf Molche und Fische.*

Von

Dieter Lenke.

(Eingegangen am 18. Januar 1950.)

Die kontaktinsektiziden Stoffe Dichlordiphenyltrichlormethylmethan (DDT) und Difluordiphenyltrichlormethylmethan (DFDT) rufen bekanntlich bei Insekten und Vertebraten Vergiftungserscheinungen hervor, die in motorischer Unruhe, Tremor, tonisch-klonischen Krämpfen, Gleichgewichtsstörungen und Lähmungen bestehen. Sie wirken also bei Vertebraten offenbar auf das Zentralnervensystem.

Bei den Kaltblütern ergab sich nach den bisherigen Versuchen ein der Vergiftung bei Insekten und den übrigen Vertebraten ähnliches Bild (vgl. Hoffmann und Lendle 1948). Schwarz (1949) prüfte die Wirkung von DDT und DFDT auf das Zentralnervensystem von Fischen und Fröschen mit Hilfe der Galvanonarkose, des galvanischen Krampfes und des Wechselstromkrampfes (Scheminzky 1924, 1936, 1941). Er fand, daß bei Fischen und Fröschen, die unter Giftwirkung stehen, die Schwelle der Galvanonarkose herabgesetzt ist, während die Schwellen des galvanischen und des Wechselstromkrampfes unverändert bleiben.

In der vorliegenden Arbeit wurde an Molchen der Vergiftungsablauf und der Gang der Galvanonarkoseschwelle beobachtet. Auch erhob sich die Frage, wie das Zentralnervensystem, das unter DDT- oder DFDT-Wirkung steht, auf zentral erregende oder lähmende Mittel reagiert. Dies wurde mit dem *Stromdosisverfahren* (Adler 1932, Scheminzky 1941) an Fischen untersucht.

Methodik.

Zur Vergiftung der Tiere wurden Emulsionen des reinen DDT und DFDT im Atemwasser nach Angaben von Hoffmann und Lendle (1948) verwendet. Zur Galvanonarkose diente die Versuchsanordnung von Schwarz (1949). Bei den Molchen wurde als Galvanonarkoseschwelle die Stromstärke registriert, bei der der Umdrehreflex erloschen war und die Tiere mit erschlafften Gliedmaßen auf dem Rücken oder auf der Seite lagen.

Als Versuchstiere dienten Teichmolche (Molge vulgaris) und kleine Süßwasserfische (Bitterling, Rhodeus amarus, und Gründling, Gobio fluviatilis).

---

* Fortsetzung der Untersuchungen über die Wirkung kontaktinsektizider Stoffe (Schwarz, dieses Archiv **207**, 609, 1949). Die Versuche wurden unter der Leitung von Prof. Dr. Friedrich Schwarz, Leipzig, durchgeführt.

Die DDT- und DFDT-Vergiftung bei Molchen.

Die Vergiftung hat eine Ähnlichkeit mit der beginnenden Strychninvergiftung. Die Tiere zuckten ab und zu zusammen. Bei leichter Berührung oder durch Klopfen auf den Tisch, auf dem die Aquarien standen, konnten diese Zuckungen ausgelöst oder zu leichten Krämpfen verstärkt werden. Bald traten diese Krämpfe auch spontan auf. Die Tiere nahmen eine Abwehr- oder Schreckstellung ein, indem sie sich auf die steif ausgestreckten Vordergliedmaßen erhoben. In dieser Stellung wurden sie von heftigen Krämpfen geschüttelt, die bei fortschreitender Vergiftung an Intensität zunahmen. Neben den Krämpfen traten Lähmungen der Gliedmaßen auf. Die Molche konnten nicht mehr schwimmen. Um einem Luftmangel vorzubeugen, wurden sie in seichtes Wasser gebracht. Später schleppten mehrere Tiere die Hintergliedmaßen bewegungsunfähig nach. Andere lagen gelähmt auf der Seite oder auf dem Rücken. Dabei krümmte sich der Körper immer noch von Zeit zu Zeit unter Krämpfen, die durch Berührung ausgelöst oder verstärkt werden konnten.

Einige Molche blieben 3 Std in einer DDT-Emulsion der Konzentration 10^{-6}. Die Vergiftung wurde nach etwa 6 Std bemerkbar. Obwohl es zu starken Krämpfen kam, erholten sich die meisten Tiere. Die Galvanonarkosestromdosen waren verringert. Die größte Abnahme wurde 6 Std nach Beginn des Versuches (Einsetzen der Tiere in die Giftemulsion) gemessen.

Andere Molche blieben bis zum Tode in einer DFDT-Emulsion der Konzentration 10^{-6}. Die Vergiftung setzte nach etwa 2—3 Std ein. Die Stromdosen blieben während der ersten Messungen bei starken Krämpfen der Tiere normal. Nach etwa 6 Std war bei einigen Tieren die Galvanonarkoseschwelle herabgesetzt, nach 12 Std war sie es bei allen Tieren. Nach 22 Std waren die Molche tot.

Zur Untersuchung der Galvanonarkosestromdosen bei nicht tödlicher DFDT-Vergiftung kamen einige Molche nach 3 Std in frisches Wasser. Bei der darauffolgenden Messung nach 3 Std 45 min waren die Stromdosen verringert. Im Verlauf einer Stunde nahmen die Stromdosen wieder zu, waren nach etwa 6 Std wieder normal und hatten nach 9 Std bei starken Vergiftungserscheinungen noch mehr zugenommen. Nach 72 Std waren wieder normale Werte erreicht.

Der Einfluß von Alkohol, Koffein und Strychnin auf die Galvanonarkosestromdosen bei Fischen, die unter DDT- und DFDT-Wirkung stehen.

Es wurden Bitterlinge und Gründlinge einer gerade noch tödlichen DDT- oder DFDT-Emulsion solange ausgesetzt, bis die Giftwirkung sichtbar und mit dem Stromdosisverfahren meßbar wurde. Die Tiere

wurden dann für kurze Zeit der Wirkung von Alkohol, Koffein oder Strychnin ausgesetzt.

Die DDT-Wirkung machte sich nach 3 Std durch die Abnahme der Galvanonarkoseschwelle bemerkbar (Tab. 1 u. 2). Die Fische waren um diese Zeit unruhig. Nach einer *Alkohol*einwirkung von 20 min war die Abnahme der Stromdosis größer als ohne Alkohol. Am nächsten Tage lagen die Werte wieder in der Nähe derer vor Alkoholeinwirkung. *Koffein* dagegen beeinflußte die Stromdosen der mit DDT vergifteten Tiere nicht. Bei alleiniger Koffeinwirkung hatten die Stromdosen zugenommen.

Tabelle 1. *Versuch vom 4. April 1949. Der Einfluß von Alkohol der Konzentration $1{,}5 \times 10^{-2}$ auf die unter Einwirkung von DDT-Emulsion der Konzentration 2×10^{-6} verminderten Galvanonarkoseschwellen. Bitterlinge, 58 und 67 mm lang. Verweildauer in DDT: 3 Std; in Alkohol: die anschließenden 20 min.*

Fisch Nr.	Galvanonarkoseschwellen					
	normal	DDT 3 Std.	Alkohol 3 Std 20 min	nach 24 Std	nach 48 Std	nach 7 Tagen
	Stromstärke in Milliamp.					
1	21	14	*11*	16	13	†
2	22	14	*8*	14	21	19

Tabelle 2. *Versuch vom 4. April 1949. Der Einfluß von Coffein. natr. salicyl. der Konzentration 4×10^{-4} auf die unter Einwirkung von DDT-Emulsion der Konzentration 2×10^{-6} verminderten Galvanonarkoseschwellen. Bitterlinge, 58—67 mm lang. Verweildauer in DDT: 3 Std; in Koffein: die anschließenden 20 min.*

Fisch Nr.	Galvanonarkoseschwellen					
	normal	DDT 3 Std	Coffein 3 Std 20 min	nach 24 Std	nach 48 Std	nach 7 Tagen
	Stromstärke in Milliamp.					
1	21	14	*13*	12	14	19
2	22	15	*13*	12	0	†
3	22,5	15	*16*	14	0	†

Alkohol- und DDT-Wirkung summieren sich, indem beide zusammen die Galvanonarkoseschwelle stärker senken, als sie es einzeln tun. Koffein- und DDT-Wirkung zusammen verhalten sich *nicht* antagonistisch gegenüber der Galvanonarkosestromdosis, da das Koffein die durch DDT-Wirkung gesenkte Galvanonarkoseschwelle nicht nach oben zu verschieben vermag. Man könnte dies mit dem Befund von Schwarz (1949) in Verbindung bringen, daß unter DDT-Wirkung die Schwellen für den galvanischen und den Wechselstromkrampf nicht verändert sind. Der Mechanismus dieser Befunde läßt sich vorläufig noch nicht deuten.

Bei beginnenden DDT- oder DFDT-Vergiftungen, die durch mäßige Unruhe und Gleichgewichtsstörungen gekennzeichnet waren, ließen sich die verminderten Galvanonarkosestromdosen bei Gründlingen durch

Strychnin so beeinflussen, daß wieder normale Werte erreicht wurden. Die Strychninwirkung machte sich ebenso wie bei den nur mit Strychnin behandelten Tieren durch gesteigerte Reflexerregbarkeit bemerkbar. Die Fische fielen infolge der DDT- oder DFDT-Vergiftung auch hier bei niedrigeren Stromstärken als sonst scheinbar in Galvanonarkose, konnten aber durch leichtes Klopfen wieder geweckt werden. Die Reflexbewegungen, die auf das Klopfen hin ausgeführt wurden, waren aber schwächer als bei alleiniger Strychninwirkung. Die Stromdosis mußte auf den annähernd normalen Wert erhöht werden, damit die Tiere auf Klopfen nicht mehr reagierten. Wenn der Strychnineinfluß in ein Stadium der Vergiftung fiel, in dem die Fische bereits mit schwächeren Bewegungen in Seitenlage schwammen, war keine Strychninwirkung mehr festzustellen.

Zusammenfassung.

Es wurde die Wirkung der kontaktinsektiziden Stoffe Dichlordiphenyltrichlormethylmethan (*DDT*) und Difluordiphenyltrichlormethylmethan (*DFDT*) auf Molche und Fische geprüft.

Bei *Teichmolchen* hat die Vergiftung Ähnlichkeit mit der beginnenden Strychninvergiftung. Neben den Krämpfen treten Lähmungen auf. Die Galvanonarkosestromdosen nehmen ab. Bei nichttödlicher DFDT-Vergiftung wurde auch eine Erhöhung der Galvanonarkoseschwelle beobachtet.

Bei Versuchen an *Bitterlingen* summierten sich Alkohol- und DDT-Wirkung, indem beide zusammen die Galvanonarkoseschwelle stärker senkten als sie es einzeln tun. Koffein und DDT zusammen wirkten nicht antagonistisch auf die Galvanonarkoseschwelle, obwohl sie einzeln antagonistisch wirken. Bei *Gründlingen* ließ sich bei beginnender DDT- oder DFDT-Wirkung durch Strychningaben die Galvanonarkoseschwelle wieder auf normale Höhe bringen. In einem späteren Stadium der DDT- oder DFDT-Vergiftung war Strychnin wirkungslos.

DDT und DFDT scheinen bei Molchen und Fischen die motorischen Zentren des Rückenmarks und höher gelegene motorische Zentren zu stören und dann zu lähmen.

Literatur.

Adler, P.: Pflügers Arch. **230**, 113 (1932). — Hoffmann, I., u. L. Lendle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 223 (1948). — Scheminzky, F.: Pflügers Arch. **202**, 200 (1924); **237**, 273 (1936). — Scheminzky, F., u. Fr., u. F. Bukatsch: Tab. biol. period. (1.; Nd) **19**, 76 (1941). — Schwarz, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 609 (1949).

Dr. Dieter Lenke, (10b) Leipzig C1, Tiroler Str. 2.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 393—398 (1950).

Aus der Medizinischen Klinik Kiel.

Kinetik der Hämiglobinbildung.

IV. Mitteilung*.

Die Hämiglobinbildung durch Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol in roten Zellen in vitro.

Von

MANFRED KIESE, DANKWART REINWEIN und HANS-DIERCK WALLER.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 21. Januar 1950.)

In zellfreien Lösungen reagiert Phenylhydroxylamin mit Hämoglobin nur einmal unter Bildung etwa eines Äquivalentes Hämiglobin je Mol Phenylhydroxylamin. Nitrosobenzol bildet unter gleichen Bedingungen

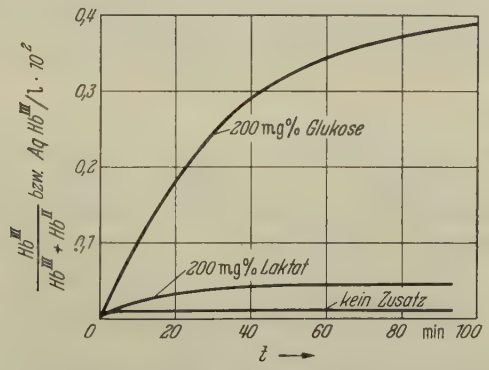


Abb. 1. Hämiglobinbildung in roten Zellen durch Phenylhydroxylamin und Sauerstoff. Hb = 10^{-2} Äq./l; Phenylhydroxylamin = 10^{-4} Mol/l. Hundezellen in Karbonat-RINGER-Lösung unter Sauerstoff mit 5% CO_2. pH = 7,4 Temp. 37° C.

mit Hämoglobin Nitrosobenzol-Hämoglobin, das ziemlich beständig ist. Werden rote Zellen vom Plasma getrennt, nach Vergärung des ihnen noch verfügbaren Substrates gewaschen und dann mit Phenylhydroxylamin oder Nitrosobenzol versetzt, so reagieren beide ebenfalls nur einmal in gleicher Weise wie in Lösungen. Wird jedoch solchen Zellen Glukose gegeben, so beginnt eine Reihe von Reaktionen, in denen jede Molekel Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol ebenso wie in vivo eine Vielzahl von Äquivalenten Hämiglobin bildet (Abb. 1). Phenylhydroxylamin und

* III. Mitt. siehe Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 305 (1950).

Nitrosobenzol sind dann gleich wirksam. Laktat und Malat vermögen die Reaktionen, die zur mehrfachen Reaktion des Phenylhydroxylamins erforderlich sind, nur unvollkommen in Gang zu bringen. Wir haben den Ablauf dieses Vorgangs gemessen.

1. Versuche.

a) Methoden.

Die Messungen wurden an roten Zellen vom Rinde, Hunde und Menschen durchgeführt. Nach mehrmaligem Waschen mit isotoner Natriumchloridlösung auf der Zentrifuge wurden in einer Versuchsreihe die Zellen in einer Phosphat-Ringer-Lösung vom p_H 6,8, bzw. 7,0 suspendiert (4 Teile karbonatfreie Ringer-Lösung + 1 Teil isotone Phosphatlösung) und in einem Kolben im Wasserbad von 37° langsam geschüttelt. Die Zellkonzentration wurde so eingestellt, daß die Gesamtblutfarbstoffkonzentration der Suspensionen etwa 17 g/100 ml betrug. Über die Zellsuspensionen wurde Luft geleitet, die bei 37° C mit Wasserdampf gesättigt war. In einer andern Versuchsreihe wurden die Zellen in Bikarbonat-Ringer-Lösung (0,6 g NaCl, 0,02 KCL, 0,03 $CaCl_2$, 0,01 $MgCl_2$, 0,2 $NaHCO_3$ je 100 ml) suspendiert und mit einem Gemisch von Sauerstoff mit 5% CO_2 im Gleichgewicht gehalten. Das p_H dieser Lösungen betrug 7,4. Glukose wurde den Zellen in einer Konzentration von 0,2 g/100 ml zugegeben. Vor und in bestimmten Zeitabständen nach dem Zusatz von Phenylhydroxylamin oder Nitrosobenzol wurden Proben entnommen zur Bestimmung des Gehaltes an Hämiglobin und Gesamtblutfarbstoff mit der Zyanidmethode[1] oder der Kohlenoxydmethode[2].

b) Ergebnisse.

Nach Zugabe von Phenylhydroxylamin oder Nitrosobenzol in Konzentrationen, die $^1/_{1000}$ bis $^1/_{10}$ der Hämoglobinkonzentration der Zellsuspensionen betrugen, begann sofort die Hämiglobinbildung. Ihre Anfangsgeschwindigkeit war von der Konzentration des Phenylhydroxyla-

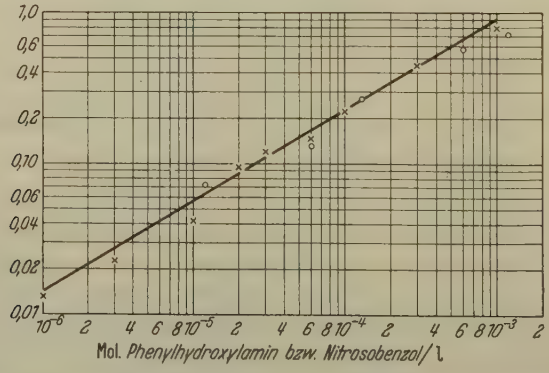


Abb. 2. Anfangsgeschwindigkeit der Hämiglobinbildung (g Hb^{III} /100 ml/min) in roten Zellen in Abhängigkeit von der Phenylhydroxylamin- bzw. Nitrosobenzolkonzentration. Hundezellen in Karbonat-Ringer-Lösung unter Sauerstoff mit 5% CO_2. Hämoglobingehalt der Suspensionen 17 g/100 ml. p_H = 7,4. Temp. 37° C. Abszisse und Ordinate logarithmisch geteilt. Die einzelnen Marken sind Mittel aus mehreren Versuchen. × × × Phenylhydroxylamin, ooo Nitrosobenzol.

mins bzw. Nitrosobenzols abhängig. Die Beziehungen zwischen Anfangsgeschwindigkeit und Konzentration des Phenylhydroxylamins sind in Abb. 2 dargestellt. Aus ihr ergibt sich, daß die Geschwindigkeit der Hämiglobinbildung in Zellsuspensionen in Gegenwart von Glukose $c^{0,4}$ proportional ist (c = Mole Phenylhydroxylamin oder Nitrosobenzol/l).

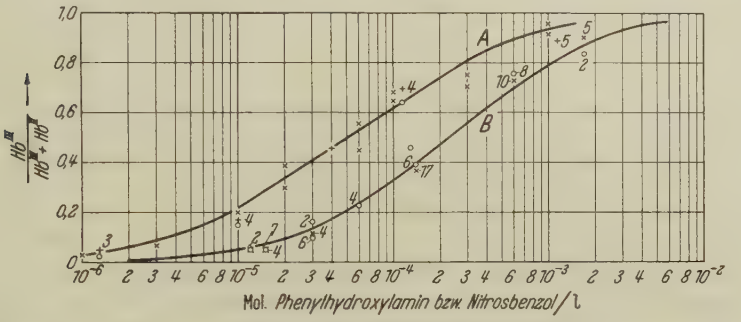


Abb. 3. Maximal erreichte Hämiglobinkonzentration in roten Zellen in Abhängigkeit von der Phenylhydroxylaminkonzentration. Kurve *A*: × × × Phenylhydroxylaminwirkung auf Rinder- und Hundezellen in Phosphat-RINGER-Lösung p_H = 6,8 unter Luft. + + + Phenylhydroxylamin, ooo Nitrosobenzol, Menschenzellen in Phosphat-RINGER-Lösung p_H = 7,0. Kurve *B*: × × × Phenylhydroxylamin, ooo Nitrosobenzol. Hundezellen in Karbonat-RINGER-Lösung unter O_2 mit 5% CO_2 p_H = 7,4. Die Ziffern neben den Marken geben die Zahl der Messungen an, links neben der Marke: Nitrosobenzol, rechts neben der Marke Phenylhydroxylamin. Temp. 37° C. In allen Ansätzen 200 mg Glukose/100 ml.

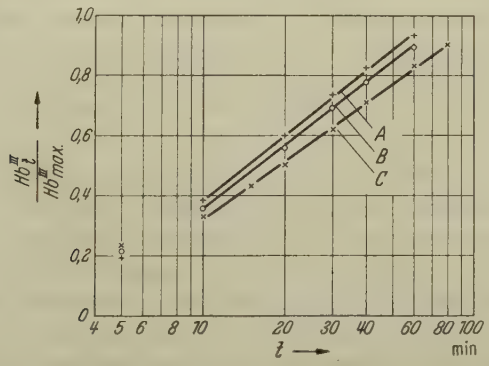


Abb. 4. Annäherung der Hämiglobinkonzentration in roten Zellen an ihren Höchstwert unter Einwirkung verschiedener Nitrosobenzolkonzentrationen. Hundezellen in Karbonat-RINGER-Lösung unter Sauerstoff mit 5% CO_2 p_H = 7,4. Temp. 37° C. Kurve *A*: 3×10^{-5} Mol Nitrosobenzol/l. *B*: $1{,}2 \times 10^{-4}$ Mol Nitrosobenzol/l; *C*: $1{,}2 \times 10^{-3}$ Mol Nitrosobenzol/l.

Logarithmisch geteilte Abszisse: Zeit in Minuten.

$$\text{Ordinate: } \frac{Hb^{III}_t}{Hb^{III}_{max}}$$

Hb^{III}_t = Hb^{III} - Konzentration zur Zeit t, Hb^{III}_{max} = maximal erreichte Hb^{III}-Konzentration.

Im einzelnen Ansatz nahm die Hämiglobinkonzentration nicht proportional der Zeit zu bis das gesamte Hämoglobin oxydiert war, sondern der Anstieg der Hämiglobinkonzentration klang mit der Zeit ab, noch bevor das gesamte Hämoglobin oxydiert war. Die maximal erreichte Hämiglobinkonzentration war von der einwirkenden Phenylhydroxylamin- bzw. Nitrosobenzolkonzentration abhängig in der in Abb. 3 dargestellten Weise. Die beiden Kurven (*B* mehr als *A*) entsprechen formal etwa Massenwirkungsgleichgewichten. Die in den Kurven *A* und *B* ausgewerteten Versuchsgruppen unterscheiden sich in der Wasserstoffionenkonzentration und dem Sauerstoffdruck in den Zellsuspensionen. In den Ansätzen der Gruppe A war die Wasserstoffionenkonzentration $p_H = 6{,}8$ bzw. 7,0 und der Sauerstoffdruck 150 Torr, in den Ansätzen der Gruppe B die Wasserstoffionenkonzentration $p_H = 7{,}4$ und der Sauerstoffdruck 680 Torr. Kontrollversuche ergaben, daß diesen Faktoren die Unterschiede der Hämiglobinkonzentration zuzuschreiben sind, weniger der Tierart, der die roten Zellen entnommen wurden. Die Annäherung der Hämiglobinkonzentration an den bei einer bestimmten Phenylhydroxylamin- oder Nitrosobenzolkonzentration erreichten Höchstwert erfolgte, nachdem die Reaktion 10 min gelaufen war, linear mit dem Logarithmus der Zeit, vorher etwas schneller (Abb. 4).

2. Besprechung.

Die Versuche zeigen, daß die im Tier beobachtete Oxydation vieler Äquivalente von Hämoglobin zu Hämiglobin bezogen auf eine Molekel Phenylhydroxylamin durch Beteiligung enzymatischer Reaktionen in den roten Zellen ermöglicht wird, welche die Energie zur Unterhaltung eines Kreisprozesses aus dem Abbau von Glukose gewinnen. Wie im Tier bildet auch Nitrosobenzol in roten Zellen, denen Glukose verfügbar ist, mit gleicher Geschwindigkeit und in gleichem Ausmaße wie Phenylhydroxylamin Hämiglobin. Werden aus der maximalen Erhöhung der Hämiglobinkonzentration — ohne Berücksichtigung der in den bis dahin verstreichenden 1—2 Std reduzierten Hämiglobinmengen — die von jeder Phenylhydroxylaminmolekel im Mittel umgesetzten Aquivalente Hämoglobin berechnet, so ergeben sich für niedrige Phenylhydroxylaminkonzentrationen Zahlen von mehreren Hundert, wie in vivo[3]. Für die höchsten untersuchten Konzentrationen von Phenylhydroxylamin (10^{-3} Mol/l) sind diese Zahlen naturgemäß klein, da bei einer Hämoglobinkonzentration von 10^{-2} Äquivalent je Liter für jede Molekel Phenylhydroxylamin überhaupt nur 10 Äquivalente Hämoglobin vorhanden sind.

Aus der Geschwindigkeit der Hämiglobinbildung ist die Wechselzahl des Phenylhydroxylamins zu errechnen, die angibt, wie oft eine Molekel Phenylhydroxylamin in der roten Zelle im Mittel je Minute zu Nitrosobenzol oxydiert und wieder zu Phenylhydroxylamin reduziert wird.

Für die niedrigsten Phenylhydroxylaminkonzentrationen (3×10^{-6} Mol/l) ergeben sich Zahlen von etwa 6. Mit steigender Phenylhydroxylaminkonzentration wird die Wechselzahl kleiner und beträgt bei einer Konzentration von 10^{-4} Mol/l nur noch 1—2.

Die beschriebenen Beziehungen zwischen Phenylhydroxylamin- bzw. Nitrosobenzolkonzentration und der Geschwindigkeit der Hämiglobinbildung sowie der maximal erreichten Hämiglobinkonzentration sollen später erörtert werden, wenn in weiteren Mitteilungen die einzelnen an dem Kreisprozeß beteiligten Reaktionen beschrieben worden sind.

Es sei hier lediglich noch untersucht, wie weit die Geschwindigkeit der Hämiglobinbildung in roten Zellen in Gegenwart von Glukose der in vivo beobachteten entspricht. Dazu vergleichen wir die nach intravenöser Injektion von Phenylhydroxylamin maximal erreichte Hämiglobin-

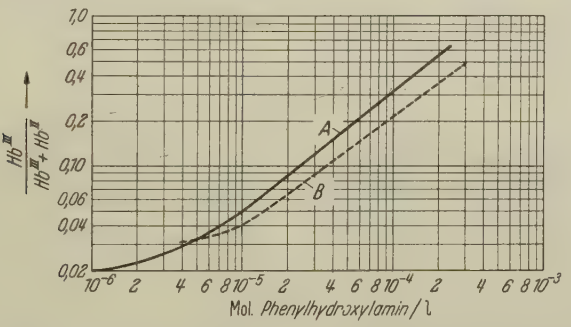


Abb. 5. Maximale Hämiglobinkonzentration im Blute von Hunden (nach Daten von Kiese und Soetbeer[3]) (Kurve *A*) und bis zum gleichen Zeitpunkt erreichte Hämiglobinkonzentration in roten Zellen in vitro (Kurve *B*) in Abhängigkeit von der Phenylhydroxylaminkonzentration. Abszisse und Ordinate logarithmisch geteilt.

konzentration mit der Konzentration, die in vitro in diesem Zeitpunkt erreicht ist. Die Phenylhydroxylaminkonzentration im Blute des Tieres wurde errechnet unter der Annahme, daß Phenylhydroxylamin ausschließlich im Blute vorhanden ist[3]. Das ist sicher nicht ganz richtig, doch wird durch die Bildung von Nitrosobenzolhämoglobin ein verhältnismäßig großer Teil des Phenylhydroxylamins im Blute gehalten. In Abb. 5 sind die so gewonnenen Werte aufgezeichnet. Die Daten für die Hämiglobinbildung in vivo wurden den Messungen von Kiese und Soetbeer[3] entnommen. Die Abbildung zeigt eine auffällige Übereinstimmung der Hämiglobinbildung in vitro und in vivo, die wohl zufällig ist, da wir die Phenylhydroxylaminkonzentration in vivo sicher zu hoch angenommen haben und die Kurve der Hämiglobinkonzentrationen im Hunde etwas weiter im Bereich niederer Phenylhydroxylaminkonzentrationen gelegen sein muß. Immerhin entsprechen die Abhängigkeit der Hämiglobinkonzentration von der Phenylhydroxylaminkonzentration

einander, und die von uns in vitro beobachtete Geschwindigkeit der Hämiglobinbildung ist sicher nicht viel geringer als die in vivo.

Zusammenfassung.

In gewaschenen und an Substrat verarmten roten Zellen reagiert Phenylhydroxylamin nur einmal mit Hämoglobin und Sauerstoff unter Bildung eines Äquivalentes Hämiglobin. Nach Zusatz von Glukose läuft die Hämiglobinbildung weiter, und es wird eine Vielzahl von Aquivalenten Hämoglobin von Phenylhydroxylamin oxydiert.

In roten Zellen, denen Glukose verfügbar ist, bildet Nitrosobenzol mit gleicher Geschwindigkeit und in gleichem Ausmaße Hämiglobin wie Phenylhydroxylamin.

Die Abhängigkeit der Geschwindigkeit und des Ausmaßes der Hämiglobinbildung von der Phenylhydroxylamin- bzw. Nitrosobenzolkonzentration wird beschrieben.

Literatur.

[1] Havemann, R., F. Jung, u. B. v. Issekutz jun.: Biochem. Z. **301**, 116 (1939). — [2] Kiese, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 190 (1947). — [3] Kiese, M., u. M. Soetbeer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 426 (1949).

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 399—403 (1950).

Aus der Chirurgischen Abteilung des Krankenhauses Bergmannsheil Bochum
(Leitender Arzt: Prof. Dr. Bürkle de la Camp).

Über Narkosen von Versuchstieren.

Von
Ulrich Ritter.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. Januar 1950.)

Eine einwandfreie Narkose von Versuchstieren ist für den Erfolg des Tierversuches entscheidend. Wenn Westhues 1947 in seiner Arbeit über Tiernarkosen „die Narkose für die Chirurgie der Tiermedizin als das noch immer wichtigste und aktuellste Problem" hinstellt, so gilt das gleiche auch für die Narkose unserer Versuchstiere, was Rein und Schneider bereits unterstrichen. Eigene Mißerfolge, die entweder in einer mangelhaften Narkose bestanden oder mit einem vorzeitigen Tod in der Narkose endeten, bestimmten uns, nach einem allgemein geeigneten und möglichst einfachen Narkoseverfahren für unsere Versuchstiere zu suchen.

Die auch heute noch in verschiedenen Laboratorien gebräuchliche Inhalationsnarkose mit Chloroform und besonders Äther haben wir von Anfang an nur in Einzelfällen angewendet. Das gewaltsame Überstülpen der Narkosemaske und die Fesselung des noch nicht narkotisierten Tieres ergaben so unschöne Bilder, die Exzitation vor Eintritt genügender Schlaftiefe eine derartige Kreislaufbelastung, daß wir uns nur zu gern grundsätzlich von dieser Anwendungsweise trennten.

Zweifellos wird die *Tiermedizin* nicht ohne weiteres auf die *steuerbare* Inhalationsnarkose verzichten können. Ihr stehen dafür aber auch Apparaturen zur Verfügung, über die Laboratorien im allgemeinen nicht verfügen dürften.

Folgerichtig wandten wir uns den *Schlafmittelnarkotika* zu. Es schien uns unverständlich, daß die beim Menschen mögliche Evipandauernarkose nicht auch beim Tier anzuwenden sein sollte. So galt es, den Gegenbeweis anzutreten, daß Schlafmittelnarkosen nicht nur für Eingriffe von kurzer Dauer und für Operationen, die kein Toleranzstadium erfordern, zu gebrauchen sind.

Im tiermedizinischen Schrifttum wird bereits die Anwendung von Chloralhydrat, Avertin (Tribromäthanol), Evipan-Natrium, Pernokton und Eunarcon (Natriumsalz von Isopropyl-β-Bromallyl-N-methylbarbitursäure) beschrieben. Während eine tiefe Allgemeinnarkose bei Tieren mit Hilfe der genannten Mittel nach gleichlautenden Berichten nicht zu erreichen ist, wird ihr Wert als Basisnarkotikum doch anerkannt und besonders die Evipan-Äthernarkose hervorgehoben.

Nach Völker und Krause ist die Rede von einer „relativen Steuerbarkeit" der Evipannarkose falsch, wenn man glaubt, durch langsame Nachinjektionen mit der Entgiftung Schritt halten zu können. Diese Auffassung wird insofern als irrig angesehen, als wohl die Zufuhr, nicht aber die Entgiftung „steuerbar" sind.

Für die Narkose unserer Versuchstiere dürfte heute der Evipannarkose der Vorrang gehören, da einmal das Mittel in jeder Klinik vorhanden ist und andererseits Evipan die größte therapeutische Breite und die geringste Giftigkeit aufweist.

Die ersten Versuche, das Evipan in die Tierheilkunde einzuführen, mißlangen. Die fortgesetzte langsame Injektion auf i.v. Wege führte zur Exzitation, aber nicht zur reflexlosen Narkose. So entstand die sogenannte „Stoßinjektion", bei der z. B. bei Hunden 0,4 cm³ der 10%igen bzw. 0,1 cm³ der 20%igen Lösung rasch i.v. eingespritzt wurden. Das etwa 1 –2 min andauernde Toleranzstadium wurde entweder zur Einleitung der Äthernarkose oder durch langsame i.v. Nachinjektion von Evipan ohne Ätherzusatz eine Narkosedauer bis zu 20 min erreicht. Barke

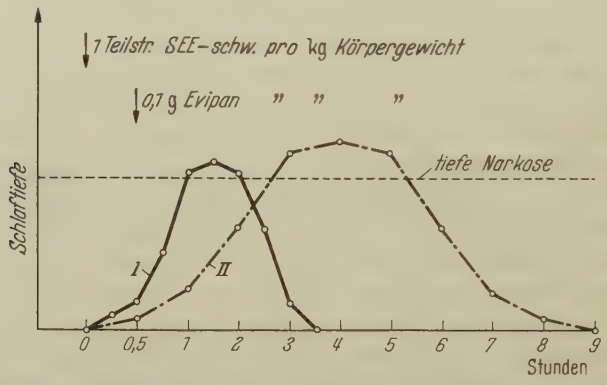


Abb. 1. Durchschnittliche Verlaufsform der i.m. Evipandauernarkose beim Kaninchen (I) und Hund (II) nach Vorbereitung mit SEE schwach.

weist auf die Nachteile dieser Narkoseart hin, da die teils schnelle, teils langsame Injektion bei einem Tier nicht nur schwierig ist, besonders wenn geschultes Hilfspersonal fehlt, sondern auch Todesfälle gesehen wurden trotz der verhältnismäßig geringen Giftigkeit der Schlafmittelnarkotika. Versuche von Krause ergaben nach dieser Anwendung eine augenblickliche Asphyxie, die einmal 45 sec anhielt, ohne allerdings zum Tode der Tiere zu führen.

Barke beschreibt die *intraperitoneale* Anwendung der Evipan-Natriumnarkose beim Hund (0,4 cm³ der 10%igen Lösung pro Kilogramm Körpergewicht), die bei kleineren Hunden zu brauchbaren Narkosen führte, wenn sie auch nur für kleinere Eingriffe ausreichte. Da auch dies Narkoseverfahren für längerdauernde Operationen nicht geeignet ist, haben wir auf seine Anwendung verzichtet.

So blieb für die *Evipandauernarkose* an Versuchstieren nur noch die subkutane und intramuskuläre Gabe. Wir zogen die *intramuskuläre* Verabreichung vor, da Auchterlonie bereits feststellte, daß besonders die subkutane Injektion von Evipan in verschiedener Konzentration starke Schmerzen verursachte. Die Schmerzempfindung bei der intramuskulären Verabreichung konnten wir durch vorherige Gaben von „SEE schwach" (je cm³ 0,5 mg Scopolaminhydrobromid, 10 mg Dihydroxy-

codeinonhydrochlorid und 25 mg razemisches Ephedrinhydrochlorid) weitgehend herabsetzen. Abwehrbewegungen sahen wir danach nur noch in einzelnen Fällen, vor allem bei Hunden, wenn die Injektion zu schnell erfolgte und neben der Schmerzhaftigkeit der Injektionslösung offenbar die umschriebene Gewebsspannung Schmerzen auslöste. Bemerkenswert ist die von Auchterlonie mitgeteilte *Reizlosigkeit* des Evipans im subkutanen wie muskulären Gewebe. Auch wir sahen nie Gewebsschäden in Form von Entzündungserscheinungen oder Nekrosen.

Der besondere Vorteil unseres Vorgehens liegt darin, daß wir sowohl die Schwierigkeiten der intravenösen Verabreichung umgehen und zu Beginn der Operation eine ausreichende Schlaftiefe haben als auch einen Narkotiseur ersparen. Die Zeit des Eintritts der Operationsreife läßt sich nach den Erfahrungen recht genau vorherbestimmen (s. S. 400, Abb. 1, S 401, Abb. 2), Die experimentellen Daten der auf der Ordinate aufgetragenen Grade der Narkosetiefe wurden nach dem Grad der Reflexerregbarkeit bis zum Eintritt der reflexlosen Narkose bestimmt.

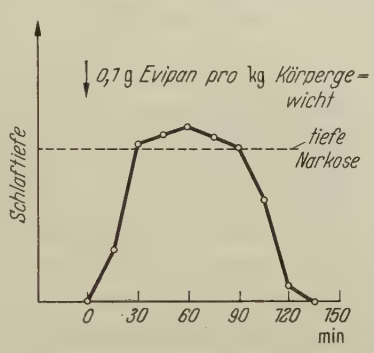


Abb. 2. Durchschnittliche Verlaufsform der i.m. Evipannarkose beim Meerschweinchen.

Anwendung. Die *Menge* des einzuspritzenden Narkotikums läßt sich für Hunde, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten und Mäuse auf ein gemeinsames Maß bringen: pro Kilogramm Körpergewicht injizieren wir 1 cm³ der gewöhnlichen 10%igen Evipan-Natriumlösung. Die Benutzung einer geringeren Dosis ist nicht zu empfehlen. Wir waren dann immer gezwungen, eine Nachinjektion vorzunehmen, die entweder zu einem tödlichen Ausgang oder gleichfalls zu ungenügender Schlaftiefe führte. Bei den größeren Tieren, d. h. vom Kaninchen bis zum Hund, geben wir als Vorbereitung eine halbe Stunde vor der Evipaninjektion pro Kilogramm Körpergewicht noch 0,1 cm³ SEE schwach.

Mit diesem Vorgehen haben wir unter 213 Tiernarkosen nur 4 Versager gehabt, ein tödlicher Ausgang wurde nicht mehr gesehen. Den Grund für die nicht genügende Schlaftiefe haben wir bei 2 Hunden wohl in einer gewissen Gewöhnung an die Narkose zu suchen, da diese bereits vorher 7 bzw. 9 Narkosen erhielten. Den Mißerfolg bei 2 Kaninchen suchen wir in der Speicherung des Narkosemittels in dem kräftig entwickelten Fettgewebe.

Wie aus den Abbildungen hervorgeht, können wir beim Hund mit einer Operationsreife von 2½ Std, beim Kaninchen und Meerschweinchen von etwa 40—60 min rechnen.

Die subkutane Vorweggabe von SEE schwach bei den größeren Versuchstieren ist außerordentlich wichtig. Sie leitet die Narkose gut ein, ohne zu einer auffälligen Belastung von Herz und Kreislauf zu führen. Das bei intravenöser Gabe ohne SEE-Vorbereitung zu beobachtende vorübergehende Absinken des Blutdrucks, die Beschleunigung der Herztätigkeit und Verminderung von Atemfrequenz und Atemvolumen wird durch die SEE-Wirkung weitgehend eingeschränkt.

Wenn im gesamten tiermedizinischen Schrifttum die intramuskuläre Evipannarkose auf Ablehnung stößt, so dürfte der Grund hierfür wohl in der fehlenden Vorbereitung mit SEE liegen. Dieses Mittel läßt sich offenbar heute noch nicht durch irgend ein anderes Präparat ersetzen. Zweifellos können durch eine vorherige Gabe von Morphin die Schmerzempfindung herabgesetzt und die Abwehrbewegungen gedämpft werden. Es ist aber bekannt, daß Hunde z. B. regelmäßig nach Morphin erbrechen und Katzen in Erregungszustände versetzt werden. Deshalb gewinnt die Vorbereitung mit SEE besondere Bedeutung. Westhues hat als Ersatz für Morphin das Eukodal verwendet, ohne aber die gleichmäßige Wirkung des Morphins erreicht zu haben, wenn auch das Erbrechen ausblieb.

In dem etwa 3—6 Std andauernden *Nachschlaf* bei Hunden sehen wir eher eine günstige Wirkung: die Operationswunde hat in der ersten Zeit nach der Operation unbedingte Ruhe und wird vor Verschmutzung bewahrt. Bei Lagerung der operierten Tiere in einem ruhigen und dunklen Raum, wo sie weder angesprochen noch berührt wurden, erfolgte das Erwachen aus der Narkose in 80% der Fälle ohne jede Exzitation.

Für entscheidend halten wir, daß genügend Zeit zwischen Injektion und Beginn der Operation liegt. Die Wartezeit ist aus den Abbildungen abzulesen, sie beträgt z. B. beim Hund im Durchschnitt 3 Std.

Die von Rein und Schneider bereits 1934 angegebene Pernoctonnarkose von Versuchstieren konnten wir für unsere größeren Versuchstiere nicht verwenden, so daß wir auch für unsere kleineren Tiere heute die i.m. Evipandauernarkose vorziehen.

Wir sind überzeugt, daß zunächst *Einwände* gegen unsere Anwendungsweise erhoben werden. Dem möchten wir entgegenhalten, daß die empirisch gefundene Dosierung kritisch festgesetzt wurde und daß kein auf die angegebene Art narkotisiertes Tier mehr starb. Für unsere Versuche brauchen wir allerdings gesunde und junge Tiere, so daß die Forderung, ältere und leberkranke Tiere von der Evipannarkose auszuschließen, erfüllt wurde. Die Mitteilung von Barke, daß die warme Jahreszeit zur Vorsicht bei Evipanverabreichung mahnt, fanden wir nicht bestätigt.

Zusammenfassung.

Nach einer kurzen Übersicht über die möglichen Tiernarkosen wird die bei uns geübte Technik der Narkose an Versuchstieren geschildert: ausreichende Schlaftiefe und genügend lange Operationsreife wurden mit intramuskulären Gaben von 0,1 g Evipan-Natrium pro Kilogramm Körpergewicht erreicht. Wichtig ist die Vorbereitung der größeren Versuchstiere mit je 1 Teilstrich „SEE schwach" (Scopolamin, Ephedrin, Eukodal = „Scophedal") pro Kilogramm Körpergewicht. Todesfälle wurden mit diesem Verfahren nicht mehr gesehen, Versager sind selten.

Literatur.

Auchterlonie, L.: Vet. Rec. **587**, 1934. zit. nach Barke, A.: Dtsch. tierärztl. Wschr. **13/14**, 1946. — Barke, A.: Dtsch. tierärztl. Wschr. **39/40**, 1948. — Kalchschmidt, H. G.: Tierärztl. Umsch. **7/8**, 1947; **15/16**, 1948. — Krause, D.: Dtsch. tierärztl. Wschr. **33/34**, 1947. — Rein, H., u. D. Schneider: Klin. Wschr. **24**, 1934. — Völker, R., u. D. Krause: Dtsch. tierärztl. Wschr. **11/12**, 1948. — Völker, R., u. A. Barke: Dtsch. tierärztl. Wschr. **46**, 1938. — Westhues, M.: Tierärztl. Umsch. **23/24**, 1947.

Dr. med. Ulrich Ritter, Bochum, Alexandrinenstr. 6.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 404—408 (1950).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. G. Kuschinsky).

Permeabilitätsänderungen durch Dicumarol unabhängig von Änderungen der Prothrombinzeit.

Von

G. Kuschinsky und H. Ludewig.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 18. Januar 1950.)

Bekanntlich wurde die Dicumarol-Wirkung auf die Blutgerinnung dadurch entdeckt, daß man bei Weidetieren nach Verfütterung von verschimmeltem Steinklee eine erhöhte Blutungsbereitschaft fand. Auch in der Klinik wurden mitunter Blutungen als Folge der Dicumarol-Therapie beschrieben[1–5].

A. Neumayr und J. Schmid[6] haben in Versuchen an Menschen, ebenso wie vorher Diehm[7] und Koller[8] eine Erhöhung der Kapillarpermeabilität nach Dicumarol beschrieben. Neumayr und Schmid fanden, daß die Wirkung der genannten Substanz auf die Gefäßpermeabilität und Prothrombinzeit (PZ) nicht immer parallel gingen.

Um diese Frage näher aufzuklären, haben wir Versuche an Mäusen durchgeführt, bei denen gleichzeitig die PZ und die Gefäßwanddurchlässigkeit experimentell bestimmt werden konnten.

Methodik.

Zur Bestimmung der Gefäßdurchlässigkeit bedienten wir uns der früher für die Rutin-Wirkung von uns beschriebenen Methode (Kuschinsky, Dupont und Hennes[9]).

Dabei wurden die Hinterextremitäten von Mäusen mit Warmblüter-Tyrode-Lösung durchströmt und außer der aus der Vena cava inf. abfließenden Flüssigkeit auch die Gewichtszunahme der Hinterextremitäten laufend gemessen. Die Hinterextremitäten der Mäuse wogen im Durchschnitt zirka 9 g bei 20 g Körpergewicht. Abweichende Gewichte wurden für die Berechnung auf 9 g bzw. 20 g korrigiert. Die Bestimmung der Prothrombinzeit geschah bei Stamm 2 nach der Methode von Quick und Lehmann modifiziert nach Halse[10]. Zur Blutgewinnung wurden die Mäuse mit Äther narkotisiert und die Herzen nach Eröffnung des Thorax punktiert. Die Mäuse erhielten eine einmalige Gabe von Dicumarol per os. Da bei den 2 benutzten Mäusestämmen die Empfindlichkeit gegen Dicumarol sehr verschieden war, erhielten 4 Tiere des Stammes 1 eine Dosis von 0,04—0,27 mg/g und 27 Tiere von Stamm 2 eine Dosis von 0,05—1 mg/g.

Versuchsergebnisse.

Ödemzunahme der Hinterextremitäten bei der Durchströmung mit Tyrodelösung nach Vorbehandlung mit Dicumarol.

Bei 4 Tieren des Mäusestamms 1 stieg während der Beobachtungszeit von 2 Std das Gewicht der Hinterextremitäten bei der Durchströmung nach vorheriger Gabe von 0,04—0,27 mg/g Dicumarol per os im Durchschnitt um 308% an, während 10 Kontrolltiere nur eine durchschnittliche Gewichtszunahme von 116% zeigten. Die Durchströmung wurde 1½—24 Std nach Dicumarol-Gabe durchgeführt.

Bei Stamm 2 wurden Dicumarol-Dosen von 0,05—1 mg/g angewandt. Die durchschnittliche Gewichtszunahme bei 10 Mäusen, welche 0,35 bis 1 mg/g Dicumarol erhalten hatten, betrug 203% gegenüber 116% bei 10 Kontrolltieren (s. Abb. 1). Die Durchströmung wurde 1—7 Std nach der Dicumarolgabe begonnen.

Eine Maus, welche die sonst tödlich wirkende Dosis von 1 mg/g Dicumarol 24 Std überlebte, zeigte nur eine Gewichtszunahme von 65%. 11 Mäuse erhielten Gaben von 0,1—0,3 mg/g Dicumarol 6—25,5 Std vor der Durchströmung. In 9 Fällen zeigte sich eine Verminderung der Ödembildung gegenüber den Kontrollen (s. Abb. 2). Die durchschnittliche Gewichtszunahme betrug 77% gegenüber 116% der Kontrolltiere.

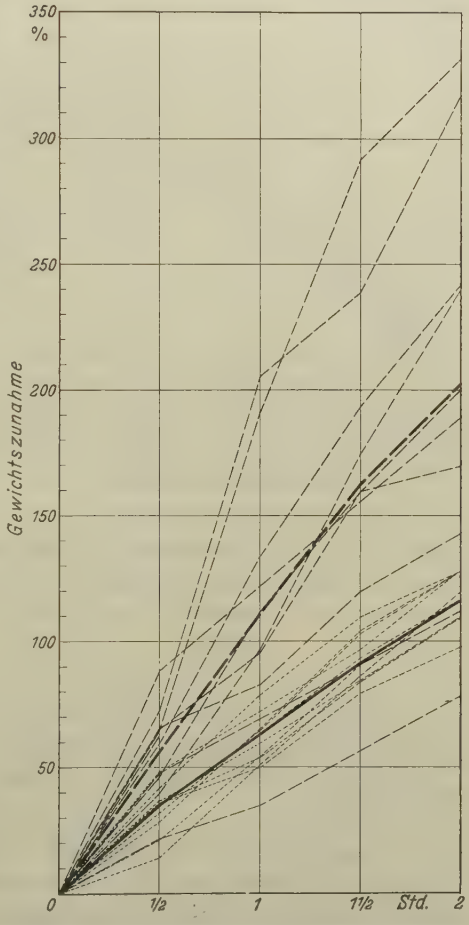


Abb. 1. Gewichtszunahme von Mäuseextremitäten nach Durchströmung mit Warmblüter-Tyrode 1 bis 7 Std nach Gaben von 0,35—1 mg/g Dicumarol per os: Zeitraum der Durchströmung 2 Std.

--------- Kontrolltiere;
— — — Dicumaroltiere;
——— Kontrolltiere (Mittelwert);
– – – – – Dicumaroltiere (Mittelwert).

Einfluß von Dicumarol auf die Prothrombinzeit und Vergleich mit dem gleichzeitigen Zustand der Gefäße

Wir haben bei den Versuchstieren des Stammes 2 die Ödemzunahme der Hinterextremitäten mit der Prothrombinzeit, die kurz vor dem Tode gemessen wurde, verglichen. Es zeigte sich, daß in den ersten 7 Std nach Dicumarol-Gaben von 0,35 bis 1 mg/g in der Mehrzahl der Fälle (8 von 10) bereits eine deutliche Verstärkung der Ödembildung vorhanden war, während zu der gleichen Zeit von 6 untersuchten Fällen nur in 1 Fall die Prothrombinzeit vermehrt war (s. Tab. 1). Die erste Einwirkung auf die Gefäßwanddurchlässigkeit war bereits nach 1 Std festzustellen. Die Wirkung auf die Prothrombinzeit zeigte sich von 11 Std ab regelmäßig bis zu 25,5 Std nach der Dicumarol-Gabe. Nur in 1 von 15 Fällen war hier die Prothrombinzeit vermindert. Um diese Zeit war in der Mehrzahl der Fälle (8 von 10) sogar eine verminderte Ödembildung vorhanden. In einem Fall wurde keine sichere Beeinflussung beobachtet, während in einem weiteren Fall vermehrte Ödembildung auftrat.

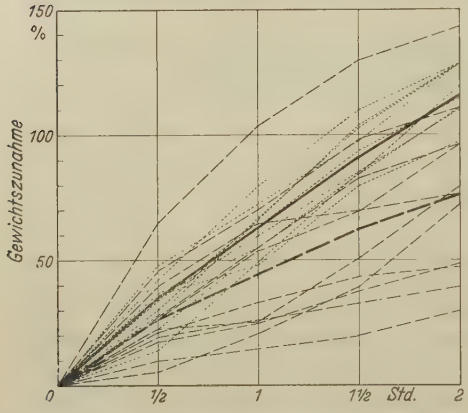


Abb. 2. Verminderung der Gewichtszunahme von Mäuseextremitäten nach Durchströmung mit Warmblüter-Tyrode 6–25 Std nach Gaben von 0,1–0,3 mg/g Dicumarol per os. Zeitraum der Durchströmung 2 Std. ..... Kontrolltiere; ------ Dicumaroltiere; ——— Kontrolltiere (Mittelwert); —·—·— Dicumaroltiere (Mittelwert).

Besprechung der Ergebnisse

Die Versuche zeigen, daß Dicumarol 2 verschiedene Wirkungen besitzt.

1. Eine Wirkung auf die Gefäßwand im Sinne einer Vermehrung der Durchlässigkeit, die meistens von einer Verminderung der Durchlässigkeit gefolgt ist.

2. Die Wirkung auf die Prothrombinbildung.

Die hier gewonnenen Ergebnisse bestätigen die Befunde von Neumayr und Schmid, die am Menschen gleichfalls zeigen konnten, daß Dicumarol auf die Gefäßpermeabilität und Prothrombinspiegel nicht immer gleichsinnig einwirkt. Es läßt sich aus diesen Versuchen nicht entscheiden, ob auch die Gefäßwirkung des Dicumarols über die Leber geht. Die direkte Durchströmung der Hinterbeine mit Dicumarollösung ist infolge der schlechten Löslichkeit des Präparates nicht möglich. Die Erkenntnis, daß eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität bei der Dicu-

Tabelle 1.

Stunden nach Gabe von Dicumarol	Dosis mg/g per os	Gewichtszunahme der Hinterbeine in % nach 2 Std	Zunahme (+) bzw. Abnahme (−) gegenüber Kontrolltieren	Prothrombinzeit in Sekunden	Zunahme (+) bzw. Abnahme (−) gegenüber Kontrolltieren
1	0,35	200	+ +	13	0
1	1	189	+ +	15	0
2	0,7	77	—	.	.
2	0,5	112	0	13	0
2,5	0,5	318	+ +	.	.
2,5	0,7	170	+ +	.	.
2,5	1	332	+ +	13	0
3	0,4	243	+ +	60	+
3	1	240	+ +	.	.
6	0,2	73	—	14	0
7	0,7	143	+ +	17	0
7,25	0,1	32	— —	15	0
11	0,05	.	.	40	+
14	0,05	.	.	135	+ +
15,5	0,1	.	.	45	+
16	0,3	39	— —	105	+ +
17	0,7	.	.	105	+ +
17,5	0,1	49	— —	42	+
17,5	0,2	80	—	45	+
18	0,2	78,5	—	120	+ +
19	0,5	.	.	9	—
19,5	0,1	143	+ +	100	+ +
22,5	0,1	47,5	— —	210	+ +
24	0,1	111	0	270	+ +
24	1	65	— —	90	+ +
24	0,1	97	—	100	+ +
25,5	0,1	97	—	150	+ +

marol-Therapie im Spiele sein kann, hat für die praktische Therapie Bedeutung, besonders in solchen Fällen, in denen schon vor der Dicumarolbehandlung eine erhöhte Durchlässigkeit der Kapillaren vorhanden ist (Ikterus, chron. Nephritis, usw.). Bemerkenswert ist, daß nach Dosen, die akut nicht tödlich wirken, nach Ablauf von mehr als 7 Std in über der Hälfte der Fälle sogar eine Verminderung der Permeabilität eintrat, wie dies in analoger Weise von Neumayr und Schmid auch am Menschen beobachtet wurde. Ob irgendein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Zunahme des Prothrombinspiegels und dieser gleichzeitig auftretenden Permeabilitätsverminderung besteht, läßt sich nicht entscheiden.

Zusammenfassung.

Bei Mäusen wurde nach Dicumarol per os in Dosen von 0,05—1 mg/g zirka 1—25 Std nach der Dicumarol-Gabe die Prothrombinzeit bestimmt

und kurz danach die Ödembildung der Hinterbeine bei der Durchströmung mit Tyrodelösung untersucht. In den meisten Fällen war innerhalb der ersten 7 Std die Prothrombinzeit unverändert, dagegen war eine erhöhte Kapillarpermeabilität eingetreten. Von 11 Std aufwärts war die Prothrombinzeit fast immer erhöht, während die Gefäßpermeabilität in der Mehrzahl der Fälle nicht mehr erhöht war. Nach akut nicht tödlich wirkenden Gaben von 0,1—0,3 mg/g Dicumarol war die Permeabilität nach Ablauf von 7 Std in der Mehrzahl der Fälle sogar vermindert. Aus den Versuchen ist zu schließen, daß Dicumarol neben der Wirkung auf die Prothrombinzeit unabhängig davon eine sehr schnell eintretende Wirkung auf die Gefäßpermeabilität hat.

Literatur.

[1] Koller, F., u. A. Pedrazzini: Schweiz. med. Wschr. **1947**, 911. — [2] Duff, J. F., u. Shull, W. H.: Journ. med. Ass. **139**, 762 (1949). — [3] Shlevin, E. L. u. M. Lederer: Am. Int. Med. **21**, 322 (1944), ref. Journ. Am. med. Ass. **139**, 762 (1949). — [4] Bingham, J. B., O. O. Meyer, u. F. J. Pohle: Am. Journ. med. Science **202**, 563 (1941), ref. Journ. Am. med. Ass. **139**, 762 (1949). — [5] Whitesell, F. B., u. A. M. Shell: Journ. Am. med. Ass. **40**, 1071 (1949). — [6] Neumayr, A., u. J. Schmid: Schweiz. med. Wschr. **1948**, 616. — [7] Diem, E.: Cardiologica **10**, 1/2 (1946), ref. nach Schweiz. med. Wschr. **1948**, 616. — [8] Koller, F.: Helv. med. Acta. April 1944, ref. Neumayr u. Schmid. — [9] Kuschinsky, G., W. Dupont, u. R. Hennes: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 138 (1949). — [10] Halse, Th.: Med. Klinik **1947**, 20.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 409—423 (1950)

Aus dem Pathologischen Institut (Direktor: Prof. Dr. Meessen) und der Klinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten (Direktor: Prof. Dr. Schreus) der Medizinischen Akademie Düsseldorf.

Klinische und experimentelle Studien zur Thiosemicarbazonwirkung.

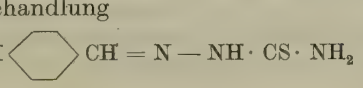
Von

O. Koch und G. Stüttgen.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. Januar 1950.)

Nach der Feststellung von Werle mit einem von uns[1], daß der Histaminasespiegel des Blutes regelmäßig bei der Tuberkulose des Menschen, bei experimentellen Tuberkulosen, bei allergischen Prozessen und einigen anderen Krankheitszuständen gesenkt ist, lag es nahe zu untersuchen, wie sich das Histamin-Histaminasesystem im Verlauf einer chemotherapeutischen Behandlung der Tuberkulose verhält. Wenn es gelingt, mit verschiedenen Chemotherapeutika das Tuberkulosebakterium in seiner Entwicklung zu hemmen und es auf diese Weise schließlich den keimvernichtenden Kräften des Organismus auszuliefern, so war wohl zu erwarten, daß sich auch im Histamin-Histaminasesystem Verschiebungen ergeben würden; wissen wir doch, daß die Tuberkulosekrankheit durch ein besonders labiles Gleichgewicht immunbiologischer Steuerungen mit Perioden größerer und geringerer Empfindlichkeit ausgezeichnet ist, das plötzlich in entscheidendem Maße durch die therapeutisch geglückte Erregerhemmung gestört werden muß. Wir hatten um so mehr Grund, diese Untersuchungen in Angriff zu nehmen, als von verschiedenen Seiten über Überempfindlichkeitsphänomene im Verlauf chemotherapeutischer Behandlungsmaßnahmen, insbesondere bei TB I-Gaben, berichtet wurde — Erytheme, Urticaria, Exantheme, Konjunktivitiden, Juckreiz, Eosinophilie, Leukopenie, positives Rumpel-Leedesches Zeichen — (Brandner[2], Heilmeyer[3], Klee[4], Pribilla und Köster[5], Sturm[6] u. a.) — und das Fermentsystem Histamin (H-Substanzen) und sein abbauendes Gegenferment eine wichtige Rolle, vielleicht die wichtigste, bei Überempfindlichkeitsreaktionen spielt. Schließlich ist es bei jeder Entzündung wirksam. Stüttgen zeigte kürzlich eine starke Verminderung der histaminolytischen Kraft des defibrinierten Vollblutes bei akuten allergisch-hyperergischen Zuständen[7]. Aus äußeren Gründen konnten wir uns vorwiegend mit dem Verhalten der Bluthistaminase im Verlauf von TB I 698-Behandlung



beschäftigen. Sowohl der Wirkungsmechanismus des Präparates überhaupt als auch Erscheinungen bei den Behandelten in Form der Überempfindlichkeitsreaktionen waren mehrfach Gegenstand von Erörterungen (siehe oben). Das Präparat greift sicher am Erreger selbst an; seine bakteriostatische Wirkung ist unumstritten (Domagk[8]). Darüber hinaus sind vielfach Beobachtungen verzeichnet, die darauf hinweisen, daß es zu weiteren, umfassenderen Wirkungen kommt. Klee denkt an Veränderungen der vegetativen Tonuslage über das dienzephale Zentralorgan, Sturm nimmt etwa gleichartige „organismische" Reaktionen an. Brandner diskutiert, ob sich das TB I als Hapten mit Nahrungsmitteleiweiß verbindet und in dieser Koppelung vollantigene Wirkungen entfalten kann. Heilmeyer kommt beim Vergleich der Wirksamkeit verschiedener bakteriostatischer Präparate in vitro und in vivo zu dem Schluß, daß beim TB I noch eine unspezifische Wirkungskomponente vorliegen muß. Er beobachtete auch bei nichttuberkulösen Erkrankungen und Zuständen hoher allergischer Sensibilisierung bei TB I-Zufuhr auffallende „Senkungsstürze". Die skizzenhaft vorläufig angedeuteten Versuchsergebnisse, Beobachtungen und Behandlungseffekte veranlaßten uns, entsprechend den früheren Untersuchungen von Werle und Koch, das Verhalten der Bluthistaminase im Verlauf der TB I-Behandlung zu prüfen.

Methodik.

Wir hielten uns in der Methodik der Histaminasebestimmung an die schon früher von uns angegebene Versuchsanordnung: 3 cm³ defibrinierten Venenblutes werden mit 3 γ Histamin einer Lösung 1:100000 (Imido Hoffmann-La Roche) versetzt und mit einer Tyrodelösung auf 4 cm³ aufgefüllt. Die mit dieser Lösung gefüllten Glaströge werden an einem Krebsarm befestigt und unter konstantem O_2-Strom 90 min in einem Wasserbade von 37° C geschüttelt. Nach dieser Zeit werden die Glaströge auf Eis gestellt und somit der fermentative Prozeß gehemmt. Die Auswertung geschieht am atropinisierten Meerschweinchendünndarm, der in einem Gefäß von 15 cm³ Inhalt aufgehängt ist. Die Fermentaktivität ist der im Blut noch nachweisbaren Histaminmenge umgekehrt proportional. Die jeweiligen Darmkontraktionen, mit Hebelübersetzung auf ein rotierendes Kymographion übertragen, wurden mit einer Histaminlösung getestet, die mit der gleichen Menge Blut desselben Patienten versehen war, dessen Histaminolyse bestimmt wurde. Durch den Zusatz des zu untersuchenden Blutes zur Testlösung wurde erreicht, daß die mögliche Beeinflussung der Darmkontraktion durch das im Blut selbst befindliche Histamin — ohne Histaminzusatz — nicht als Fehlerquelle für die Eichung der Höhe der Darmkontraktion in Betracht kam. Kontrollansätze mit

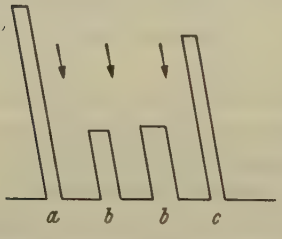


Abb. 1. Nachweis der Histaminolyse im Blut an Hand des nichtabgebauten Histamins (biologische Differenzmethode). a = 0,4 cm³ des Ansatzes i. Eisschrank; b = der gleiche Ansatz nach 1½ std. Schütteln bei 37°; c = 0,4 cm³ defibriniertes Blut des gleichen Pat. mit Zusatz von 0,2 Histamin. Die Austestung mit Histaminstandardlösung ergab: a = 0,33 γ, b = 0,15 γ; c = 0,24 γ Histamin.

gleichen Zusätzen wie im Versuch, deren Histaminolyse aber durch Aufbewahrung im Eisschrank unterbunden war, demonstrierten gut das Ausmaß der Histaminolyse in bezug auf die Ansätze bei 37°. Wir hatten damit gleichzeitig Gelegenheit, die histaminolytische Aktivität des Blutes überhaupt zu prüfen.

An 10 Blutproben von *nichttuberkulösen* Patienten, die wir 14 Tage lang zweimal wöchentlich untersuchten, ließ sich die Histaminolyse regelmäßig um 1,4, mit einer Schwankungsbreite nicht über ∞ 10% bestimmen. Wir heben diese Tatsache im Hinblick auf die Beurteilung unserer Versuchsergebnisse mit plötzlichen starken Schwankungen des Histaminabbaus im Blut besonders hervor. Damit kommen wir zu gegenteiligen Ergebnissen wie Anrep, Barsoum und Ibrahim[9]. Mit anderer Methodik gewonnene Befunde ließen sie zu dem Schluß kommen, daß das Blut normalerweise keine histaminolytischen Fähigkeiten habe. In unseren Untersuchungen zeigte die Histaminolyse des einzelnen Normalblutes ohne medikamentöse Einwirkung die erwähnte, statistisch zu sichernde bemerkenswerte Konstanz.

Unsere ersten Untersuchungen wurden an Blutproben von Patienten durchgeführt, die verschieden lange Zeit TB I erhalten hatten. Wir wollten auf diese Weise mit Stichproben ein Urteil über die mögliche Schwankungsbreite gewinnen. Die Ergebnisse waren folgende:

Tabelle 1.

Lfd. Nr.	Pat.	Alter	Tage TB I	Menge TB I in g	Histaminaseaktivität	Diagnose und Entwicklung
1	Gr. m.	26 J.	24	1,125	0,0	Kleinkavernöse Oberfeldtbk. li. m. fragl. Streuung ins re. Mittelfeld. Entw. günstig.
2	Sch. w.	25 J.	35	2,275	0,0	Doppels. Lu.-Tbk. mit linkss. Kaverne. Entw. günstig; entlassen.
3	Mü. w.	24 J.	6	0,175	0,0	Frische linkss. Lu.-Tbk. fiebernd. Entw. günstig; entlassen.
4	Ri. w.	39 J.	8	0,225	0,0	Rechtss. Mittel- u. Unterfeldtbk. mit vereinzelten Streuherden in die li. Lunge. Entw. günstig; entlassen.
5	Kü. w.	26 J.	132	9,175	0,0	siehe Text.
6	Hü. w.	30 J.	207	18,525	0,0	gestorben, siehe Text.
7	Je. m.	35 J.	22	0,52	0,2	Doppels. offene Lu.-Tbk. Pnth.-Kaustik-Exsudat. Entw. wenig Besserung.
8	Ho. w.	40 J.	75	4,15	0,2	Doppels. Lu.-Tbk. mit Kaverne li. Entw. sehr langsam bessernd.
9	Ka. w.	29 J.	17	0,55	0,2	Doppels. Lu.-Tbk. mit Kaverne rechts. Entw. günstig.
10	Fe. m.	28 J.	43	2,15	0,4	Doppels. kavernöse Lu.-Tbk.-Pnth. bds., Kaustik, Pleuritis. Entw. günstig.

Tabelle 1 (Fortsetzung).

Lfd. Nr.	Pat.	Alter	Tage TB I	Menge TB I in g	Histaminaseaktivität	Diagnose und Entwicklung
11	Th. w.	42 J.	91	7,30	0,5	Kavernöse linkss. Lu.-Tbk. mit Kehlkopftbk. Entw. allgemeine Besserung, rö. keine.
12	Bü. w.	52 J.	77	3,375	0,6	Schwere doppels. Lu.-Tbk. mit großen Kavernen. Entw. Exitus.
13	Zo. m.	38 J.	172	17,4	0,6	Doppels. kavern. Lu.-Tbk. mit Pleuritis-Bronchialfistel nach Monaldi. Entw. schwankend — ungünstig.
14	Mü. m.	36 J.	64	3,15	0,8	Doppels. kavernöse Lu.-Tbk. Entw. günstig.
15	Mü. m.	37 J.	4	0,2	1,0	Linkss. chron. kavernöse Oberfeldtbk. Entw. günstig.
16	Bu. m.	63 J.	34	2,025	1,0	Doppels. kavernöse Lungentbk. Entw. unverändert.
17	Wa. w.	48 J.	62	4,92	1,1	Chron. vernarb. Tbk. d. re. Ober- u. Mittelfeldes mit großer Kaverne re. Streuung links. Entw. wesentl. Besserung mit zunehmender Vernarbung u. Rückgang der Streuung.
18	Be. m.	28 J.	38	2,0	1,2	Vorwiegend rechtss. Ober- und Mittelfeldtbk. Kaustik-Seropneu. Entw. günstig.
19	Si. m.	26 J.	11	0,35	1,2	Großherdige, weichfleckige, kavernöse Oberfeldtbk., Streuung re. Pnth. beiders. Entw. günstig.
20	Kr. m.	32 J.	44	2,66	1,2	Rechtss. Lu.-Tbk.-Pyopneumoth. Entw. günstig.
21	Ko. m.	21 J.	95	5,22	1,2	Doppels. kavern. Lu.-Tbk.-Pnth. Entw. stationär.
22	Kl. w.	34 J.	40	2,895	1,2	Rechtss. kavernöse Lu.-Tbk. mit starker Schrumpfungstendenz. Entw. zur Plastik.
23	Ra. m.	38 J.	49	2,65	1,4	Doppels., vorw. linkss. Oberfeldtbk. mit Kaverne, Streuung links. Entw. günstig.

Die Tabelle zeigt ein stark wechselndes Bild. Die Werte schwanken zwischen 0 und 1,4. Damit sind einerseits Werte gegeben, die man mit unserer Methode äußerst selten bei anderen Zuständen beim Menschen erhält, nämlich ein Absinken der Histaminaseaktivität auf 0; andererseits entspricht der Wert von 1,4 etwa dem Normalwert eines Gesunden. Vergleicht man den Abfall der Histaminaseaktivität mit der Dauer der Behandlungszeit, so ist kein Zusammenhang abzulesen, immerhin finden wir 0-Werte für die Histaminaseaktivität schon nach 6 und 8 Behandlungstagen bzw. nach 0,175 und 0,225 g TB I.

Auch die Schwere des Prozesses ließ keinen Schluß auf die zu erwartende Abbaufähigkeit des Patientenserums zu. Die 6 Kranken, die die 0-Werte ermitteln ließen, leiden bzw. litten an schweren Lungentuberkulosen mit Kavernen. Ebenso finden sich auch etwa gleichgeartete Tuberkulosen unter denen, bei denen wir hochliegende, den Normalwerten nahekommende Zahlen für die Menge abgebauten Histamines bestimmen konnten. Eine genaue Analyse der Befunde im Zusammenhang mit dem Gesamtverlauf — den wir nach dem jetzigen Stand, rund 180 Tage nach den Bestimmungen, in der Tabelle stichwortartig angeführt haben — gibt allerdings wesentliche Hinweise, die prognostisch verwertbar sind. Wir werden sie mit weiteren Versuchsergebnissen im Zusammenhang diskutieren.

Eine biologische Reaktion kann nicht oder nur schwer im einmaligen Querschnitt beurteilt werden, sondern im allgemeinen nur bei der laufenden Beobachtung, da gleiche Werte für 2 Untersuchte etwas durchaus verschiedenes darstellen können, je nach der Ausgangslage. Das muß besonders für ein bei Entzündungsprozessen mit bekannter, schwankender immunbiologischer Situation in seiner Tätigkeit so schnell wechselndes Fermentsystem gelten, wie das hier in Frage stehende. Wir haben deshalb die Histaminaseaktivität des Serums einer Reihe von tuberkulösen Patienten vor der ersten TB I-Medikation und dann zu verschiedenen Zeitpunkten während der Behandlung bestimmt. Das am stärksten auffallende Ergebnis waren entscheidende Verminderungen der Histaminaseaktivität in den ersten 3 bis etwa 14 Behandlungstagen. Wir geben — in einem Koordinatensystem vereinigt — die Werte von 4 Patienten wieder:

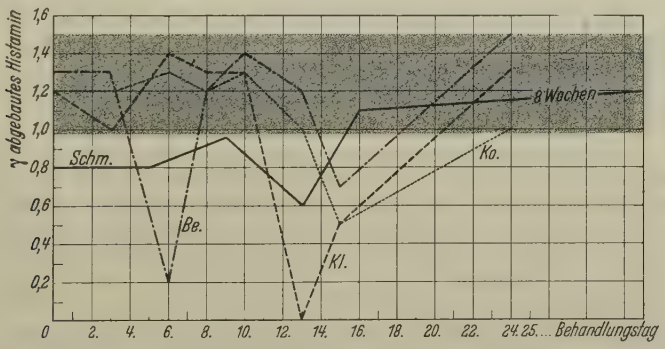


Abb. 2. Histaminaseaktivität — in γ abgebautem Histamin — vor und im Verlauf der TB I-Behandlung der Pat. Schm., Ko., Kl. und Be. (vgl. auch Text). Schattiert: individuelle Schwankungsbreite der Norm.

Die Kurven zeigen, daß die histaminabbauende Kraft zwischen 6 und 15 Tagen nach Behandlungsbeginn krisenhaft fällt, um sich danach wieder etwa auf die Ausgangshöhe einzustellen. Die Tatsache, daß die Werte wieder auf die Ausgangshöhe einspielen, beweist, daß es sich nicht um ein zufälliges Ergebnis, sondern um eine krisenhafte Störung des Fermentsystemes handelt.

In zahlreichen früheren Bestimmungen bei Menschen von Werle und Koch, Westphal[10], Schweitzer[11] und Geks[12] sind derartige Einbrüche der Fermentaktivität nie gesehen worden. Um das Absinken als durch die Behandlung ausgelöst zu sichern, wurden die von uns untersuchten Patienten vor Behandlungsbeginn bis zu 14 Tagen ausgetestet. Schließlich haben wir in jeder Untersuchungsreihe Kontrollen laufen lassen, die nie das krisenhafte Absinken der histaminolytischen Kraft erkennen ließen.

Nur in einer früheren Tier-Versuchsreihe von Werle und Koch (1948) finden sich derartige Einbrüche. Werden männliche Meerschweinchen, deren Histaminaseaktivität um einen Mittelwert von 1,2 ($= \gamma$ abgebautes Histamin) schwankt, tuberkulös infiziert, so sinkt die Fermentaktivität ohne irgendwelche Behandlung regelmäßig reproduzierbar im Verlaufe von 3—4 Wochen auf 0 ab, um dann wieder anzusteigen. Dieser Befund erscheint uns wertvoll in Parallele zu der jetzt von uns bei der Thiosemicarbazon-Behandlung Tuberkulöser festgestellten Verminderung der Histaminasetätigkeit. Das Ergebnis im Tierversuch, daß allein die tuberkulöse Infektion und die in Gang kommende tuberkulöse Entzündung eine mindestens sehr ähnliche Änderung in dem Fermenthaushalt machen, weist darauf hin, daß die Beeinflussung des Histaminasespiegels in den vorgelegten Untersuchungsbefunden wahrscheinlich nicht durch direkte Medikamenteinwirkung auf das Fermentsystem, sondern über den Umweg der Entzündungsbeeinflussung geht. Wir werden später darauf zurückzukommen haben.

Bei der TB I-Behandlung fällt der Zeitpunkt, zu dem die beobachtete große Schwankung der Histaminaseaktivität eintritt, etwa mit den Daten zusammen, zu denen von zahlreichen Autoren bei einem Teil von TB I-behandelten Tuberkulösen Überempfindlichkeitssymptome beschrieben wurden.

Aus den Krankengeschichten der wiedergegebenen Fälle seien folgende Daten skizziert:

Schm., männl., 38 J. Schwere, doppelseitige, großherdige, weichfleckige Tuberkulose, sichere Kaverne rechts; offen. TB I seit 25. 6. 49. BSG von 48/85 — 25/57 — 30/65. Gewichtszunahme, Sputum negativ. Rö.: gute Entwicklung, Kaverne kleiner.

Ko., männl., 26 J. Vorwiegend rechtss. Oberlappentuberkulose mit Kaverne und Pleuraverwachsungen. TB I seit 2. 9. 49. Temperaturen zunächst unruhig. BSG 10/22, leichte Gewichtszunahme. — Pneumothorax, Kaustik. Allgemein gute Entwicklung, gute Gewichtszunahme, Sputum noch positiv. Temperaturen normalisiert.

Be., männl., 29 J. Doppelseitige kleinherdige, dichte Ober- und Mittelfeldtuberkulose mit linkss. Pnth. TB I seit 2. 9. 49. Gewichtszunahme, Temperaturen normalisiert. BSG gesenkt, Allgemeinzustand sehr gut; insgesamt gute Entwicklung.

Kl., weibl., 43 J. Doppelseitige, exsudative, offene Oberfeldtuberkulose, Kehlkopftuberkulose, seit 20 Jahren krank, seit 1 Jahr offen. TB I seit 31. 8. 49. Gewichtszunahme, allgemeine Besserung. Pnth.-Kaustik. Kaverne besteht. Nach Hause entlassen.

Es handelt sich in allen 4 Fällen (Abb. 2) um schwere tuberkulöse Lungenprozesse. Die Gesamtentwicklung ist sowohl objektiv als auch nach dem klinischen Eindruck eine günstige. Das Medikament löst offenbar bei diesen in ihrem Tuberkulosegeschehen relativ günstig liegenden Patienten eine Reaktion aus, die eine erhöhte Histamin- bzw. H-Substanzwirksamkeit mit sich bringt. Ihre Bedeutung wollen wir später diskutieren.

Die in den genannten 4 Beispielen — von 14 Fällen — konstatierte, starke, vorübergehende Hemmung der Histaminaseaktivität ist keine gesetzmäßige. Wir beobachteten auch 3 Kranke, bei denen die Werte stärker schwankten oder wenig

Änderung zeigten oder auch umgekehrte Reaktionen erkennen ließen; das sind allerdings die Ausnahmen. In einem Falle (Si.) fand sich schon vor der TB I-Behandlung eine Histaminaseverminderung bis 0, ein sehr seltenes, außergewöhnliches Verhalten.

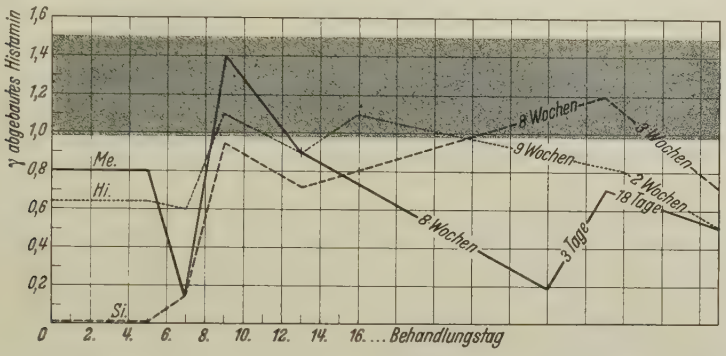


Abb. 3. Histaminaseaktivität — in γ abgebautem Histamin — vor und im Verlauf der TB I-Behandlung der Pat. Me., Hi. und Si. mit schwankender, fast unveränderter und umgekehrt ablaufender Fermenttätigkeit im Vergleich zu Abb. 3 (vgl. auch Text). Schattiert: individuelle Schwankungsbreite der Norm.

Pat. Me. der Abb. 3, der nach einer starken Verminderung der Histaminaseaktivität am 7. Tage einen Anstieg über und auf die Ausgangswerte bis zum 13. Tag nachweisen ließ, zeigte 8 Wochen später einen fast ebenso starken Abfall wie am 7. Tag und anschließend ein Schwanken um tiefe Werte. Klinisch: weibl., 50 J. Kavernöse rechtsseitige Lungentuberkulose mit Streuung links. TB I seit 24. 6. 49.

Unter TB I Vermehrung der *Streuung nach links*. Heute leichte Besserung, Temperaturen normalisiert, röntgenologisch Herdbildungen wenig härter.

Pat. Hi. der Abb. 3 mit nur sehr geringer Änderung der Fermentaktivität war nach geringen Schwankungen am 51. Behandlungstag etwa wieder auf dem Ausgangswert — vor TB I-Behandlung — angekommen. Klinisch: weibl., 36. J. Beiderseitige, vorwiegend rechtsseitige Lungentuberkulose mit Kaverne rechts. TB I seit 24. 6. 49. Allgemeinbefund gebessert. Röntgenbefund *keine* Veränderung bis heute.

Pat. Si. der Abb. 3 ging von 0-Werten vor der TB I-Zufuhr und während der ersten 5 Behandlungstage auf leicht schwankende, etwas unter der Norm liegende Werte hoch. Klinisch: männl., 46 J. Doppelseitige, offene, großherdige, weichfleckige Ober- und Mittelgeschoßtuberkulose; unsichere Kaverne links. TB I seit 24. 6. 49.

Pneumothorax links angelegt mit *Besserung* des Lungenbefundes *links* — Kaustik. Prozes *schreitet* dagegen rechts *fort* mit sicherer Kavernisierung, offen. Subjektives Wohlbefinden, aber Gewichts*ab*nahme.

Eine Gesamtübersicht über die klinischen Befunde der in Abb. 3 wiedergegebenen Fälle läßt den Krankheitsverlauf im ganzen entsprechend den bestimmten Histaminasewerten erkennen. Der Patient Me., der während der TB I-Behandlung eine Ausbreitung des tuberkulösen Prozesses erlebte, bessert sich nur sehr langsam: labiles klinisches Verhalten. Der Patient Hi., der praktisch keine Änderung der

Histaminaseaktivität aufzeigen ließ, ist in seinem Lungenbefund unverändert, während er allgemein gebessert erscheint. Offenbar keine entscheidende Reaktion nach der einen oder anderen Seite. Der Patient Si., dessen Kurve von den als außergewöhnlich zu bezeichnenden O-Werten vor der Behandlung auf leicht schwankende, etwas unter der Norm liegende Werte kam, hat eine ausgesprochen ungünstig verlaufende Tuberkulose. Der Lungenprozeß auf der Pneumothoraxseite besserte sich nach dem Lungenkollaps, während er auf der nichtentspannten Seite fortschreitet, eine Kaverne auftrat und das Gewicht abnimmt. Der Patient fühlt sich subjektiv wohl. Hier begann die Behandlung anscheinend zur Zeit eines neuen Schubes und die Vorwärtsentwicklung ist noch nicht zum Stillstand gekommen (doppels., großherdige, weichfleckige Tuberkulose!).

Wir haben schließlich bei zwei Patienten O-Werte bestimmt, von denen der eine, Hü. (Tab. 1, Nr. 6), nach einer Behandlungsdauer von 207 Tagen mit 18,525 g TB I kurze Zeit nach der letzten Bestimmung an einer schwersten doppelseitigen kavernösen Lungentuberkulose mit Kehlkopfbeteiligung starb. Der zweite Patient Kü. (Tab. 1, Nr. 5) litt während der Bestimmung des O-Wertes an einer rechtsseitigen kavernösen Lungentuberkulose mit tuberkulösem Pleuraempyem und galt prognostisch als hoffnungslos. Unter konsequenter Behandlung bildete sich das Empyem zurück, und die Kranke ist jetzt gebessert.

Ein O-Wert oder tiefliegender Wert der Histaminaseaktivität kann demnach grundsätzlich weder als günstig noch als ungünstig bezeichnet werden, entscheidend ist die *Entwicklung* der Fermentaktivität. Hier ist es aber offenbar so, daß das baldige Absinken des Histaminasespiegels im Blut nach Einsetzen der TB I-Behandlung, also ein Histamin- bzw. H-Substanzen-Überwiegen, eine günstige reaktive Umstellung anzeigt, während ein O- oder tiefliegender Wert nach langer Behandlungsdauer nicht der Ausdruck eines günstig zu wertenden Abwehrmechanismus, sondern eher eines Zusammenbruches des Fermentspieles mit dauerndem Dominieren der erhöhten Histaminwirksamkeit im Sinne eines unaufhaltsamen, fortschreitenden, intensiven Entzündungsprozesses ist.

Die Histamin- und Histaminaseaktivität sind physiologische Regulationsmechanismen und im Sinne der Definition der reaktiven Prozesse im krankhaften Geschehen als Steigerungen der physiologischen, evtl. als pathophysiologische Reaktionen zu betrachten. Es hieße, das Problem der Reizbeantwortung gänzlich unbiologisch verstanden zu haben, wenn wir absolut gleichartige Wertänderungen im Verlaufe einer Krankheit erwarten, ja wünschen würden. Ausgehend von einer individuell gebundenen konstitutionellen Reaktionsbasis wird auf den gleichen Reiz eine durchaus verschiedene Reizbeantwortung erwartet werden können. Noch ausgeprägter werden wir im Rahmen des krankhaften Geschehens diskordante Reaktionen erleben, je stärker Reiz und Reizbeantwortung

(Möglichkeit) divergieren, je weniger also der Organismus imstande ist, die pathogenen Reize kompensierend zum Zwecke der Sicherung seiner Existenz zu beantworten; mit anderen Worten, je kranker er ist durch Erregerübergewicht oder seine dauernde konstitutionelle oder zeitbeschränkte dispositionelle Reaktionsmöglichkeit.

Die Histaminwirkung ist eine lebensnotwendige und erwünschte Fermenttätigkeit. Wir brauchen ihre Wirksamkeit zur Entzündungsförderung, zur „inneren Verdauung" mit dem Effekt der Gewebsreinigung. So können wir in unseren Fällen, die wir als prognostisch günstig bezeichnen dürfen, annehmen, daß das bald nach dem Einsetzen einer ansprechenden Behandlung mit TB I festzustellende Histaminübergewicht, entsprechend der Senkung der Histaminaseaktivität, Ausdruck einer anfänglich verstärkten entzündlichen Reaktion zur Einleitung des Konsolidierungsprozesses ist. Die Kliniker berichten dementsprechend, daß bei direkt zu beobachtenden Tuberkulosen an Oberflächen im Beginn der TB I-Behandlung verstärkte entzündliche Reaktionen mit Exsudationen zu erkennen sind. Eine derartige anfängliche, intensiv aufräumende, reinigende Reaktion kann auch über das Ziel hinausschießen (Hyperergie-Anaphylaxie) und zur lokalen Gewebszerstörung führen, in den Fällen einer Tuberkulose zur Verkäsung oder Erweichung. Auch das sind Beobachtungen, wie sie im Beginn der TB I-Behandlung (zum Teil auch durch Fehldosierung) gemacht wurden. Klee bezeichnet eine unter entsprechenden Bedingungen beobachtete Einschmelzung als „allergische Kaverne".

Um einen Einblick in die möglichen direkten Beeinflussungen zwischen dem Thiosemicarbazon und den im tuberkulösen Herd bzw. Organismus wirksamen Substraten zu erhalten, haben wir einen biologischen Modellversuch geschaffen. Wir ließen Gewebsextrakt mit histaminaufbauender Fähigkeit und Histaminasegehalt, TB VI (wasserlösliches Thiosemikarbazonderivat), Tuberkulin und Histamin in verschiedenen Ansätzen unter wechselnden Bedingungen (aktiv und inaktiv) zusammentreffen. Wir sahen, daß sich Wirkungen des Thiosemicarbazones als auch des Tuberkulins nachweisen lassen, wenn wir sie den Ansätzen isoliert zugeben. Diese Effekte heben sich auf oder schwächen sich ab, wenn wir die Substanzen gleichzeitig wirksam werden lassen

Versuchsanordnung.

Verwandte Substanzen: Nierenextrakt (mit histaminsynthetisierender Fähigkeit) (Holtz[13] u. Werle[14]): 2 g Niere in Seesand zerrieben unter Zusatz von 60 cm³ Tyrode.
TB VI-Zusätze: handelsübliche TB VI-Ampullen, Bayer-Leverkusen.
Tuberkulin-Zusätze: Alttuberkulin einer Lösung 1:500.
Histamin-Zusätze: Imidolösung Hoffmann-La Roche.
Dauer der Ansätze: 3 Std bei 37° bzw. 0°.
p_H der Ansätze: 7,8.
Injektionsmenge: 0,5 cm³ der Ansätze.

Tabelle 2.

Lfd. Nr.	Extrakt (Niere)	Temp. des Ansatzes in °C	TB VI	Histamin in γ	Tuberkulin	Ausgetestete H-Substanzen des gesamten Ansatzes in γ
1	5 cm³	0	—	—	—	1,5
2	5 cm³	37	—	—	—	3,0
3	5 cm³	0	0,1 cm³	—	—	3,5
4	5 cm³	37	0,1 cm³	—	—	3,0
5	5 cm³	0	0,1 cm³	—	0,5 cm³	1,5
6	5 cm³	37	0,1 cm³	—	0,5 cm³	3,0
7	5 cm³	37	0,1 cm³	15	—	15,0
8	5 cm³	37	—	15	0,5 cm³	9,5
9	5 cm³	37	0,1 cm³	15	0,5 cm³	15,0
10	—	37	0,1 cm³	15	0,5 cm³	15,0
11	—	37	0,1 cm³	15	—	15,0

Eine Eigenwirkung des TB VI bzw. des Tuberkulins in den in der Tab. 2 angegebenen Konzentrationen konnte am Darmpräparat nicht festgestellt werden; d. h. die Kontraktionen bleiben bei Ausschaltung des Organextraktes unbeeinflußt. Erst bei 50fach höherer Dosierung des TB VI ist eine einwandfreie verringerte Ansprechbarkeit des Darmes auf Histamin zu ersehen, ein Effekt, der durch Darmspülung reversibel ist (Abb. 4). Er spielt für unsere Versuchsanordnung keine Rolle; auf 20 mg TB VI ist eine geringe Kontraktion des Darmes, die etwa 0,05 γ Histamin entspricht, zu ersehen.

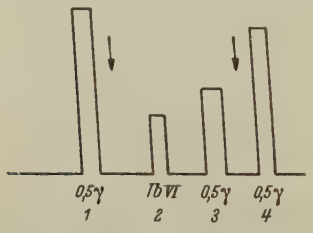


Abb. 4. Einwirkung von TB VI in hoher Dosierung auf den Darm; durch Spülung reversible Abschwächung der Darmkontraktion. Die Spülung des Suspensionsgefäßes ist durch Pfeile markiert (vgl. Text). 1. 0,5 γ Histamin; 2. 0,5 cm³ TB VI; 3. 0,5 γ Histamin; 4. 0,5 γ Histamin.

Ohne auf den Mechanismus der gegenseitigen Beeinflussung von TB VI und Tuberkulin im einzelnen näher eingehen zu wollen, dürfen wir nach den mehrfach wiederholten, reproduzierbaren Versuchsergebnissen Tab. 2 annehmen, daß eine Einwirkung auf einen fermentativen Prozeß und eine chemische Affinität der beiden Stoffe zueinander in Frage kommt: 1. Die unter 1—6* wiedergegebenen Ergebnisse besagen, daß eine H-Substanz freisetzende Wirkung des TB VI auf den Organextrakt besteht (3)* und weiter eine chemische Affinität zwischen TB VI und Tuberkulin vorliegen muß (5)*. Am kälteinaktivierten Organextrakt löst TB VI eine erhöhte H-Substanz-Freisetzung aus (3)*, die durch Tuberkulin (in der Kälte) aufgehoben wird (5)*. 2. Die Inaktivierung von Histamin durch Tuberkulinzusatz im extrakthaltigen Ansatz (8)* ist durch TB VI aufhebbar (9)*. Die unter 2 angegebene Wirkung entspricht dem Ergebnis von Brandner, der eine Aufhebung oder starke Verminderung der Tuberkulinwirkung in der Tuberkulinsalbe nach-

* Diese Zahlen beziehen sich auf die Nummern der Ansätze aus Tab. 2.

weisen konnte, wenn er die Salbe einige Zeit vor der Einreibung beim Tuberkulinpositiven mit TB I vermischt hatte. Auch das spricht (Heilmeyer) für eine chemische Reaktion zwischen Bestandteilen des Tuberkulosebakterienextraktes — wir möchten nicht von dem „Toxin" sprechen, da das Tuberkulin heute weder chemisch noch biologisch als klar definiert bezeichnet werden kann — und dem Thiosemikarbazon.

Wie kann die Änderung der Histaminaseaktivität, praktisch das Absinken bis zum krisenhaften Sturz, gedeutet werden? Wir haben eine Reihe von Möglichkeiten zu erwägen:

1. eine direkte Einwirkung des Thiosemicarbazones auf die Histaminase;

2. sie ist der Ausdruck einer Histamin- bzw. H-Substanzausschüttung bei Gewebszerfall mit Blockierung der Histaminase;

3. sie ist der Effekt einer vermehrten Resorption von tuberkulinartigen Substanzen aus Entzündungsmaterial evtl. aus zerfallenden Erregern mit intensiver Antigen-Antikörperreaktion;

4. sie ist der Ausdruck einer direkten Mobilisierung von Abwehrmechanismen durch Einwirkung des Medikamentes auf das Retikelzellsystem, oder vielleicht über zentralnervöse Steuerungen;

5. sie ist der Ausdruck einer selbständigen antigenen Wirksamkeit des Medikamentes.

Zu 1. Eine direkte inaktivierende Beeinflussung gereinigter Histaminasepräparate durch das allerdings schlecht wasserlösliche TB I (als auch durch Streptomyzin) konnte in vitro am atropinisierten Darmpräparat in therapeutischer Dosierung ausgeschlossen werden (Schreus und Stüttgen[15]). Erst in höherer Dosierung von 1,5 mg/cm³ defibriniertem Blut wie auch von 1,5 mg/cm³ Organextrakt mit ausgeprägter histaminolytischer Fähigkeit (Lunge) ist eine Hemmung der Histaminolyse zu erreichen. Die Thiosemicarbazone sind also keine hochwirksamen Hemmkörper der Histaminase in vitro wie Semicarbazid oder Phenylhydrazin, die in Mengenverhältnissen von 10^{-6} eine Hemmung der Histaminase als auch der Histidindekarboxylase erreichen.

Ingeborg Heilmeyer fand soeben, daß im Organismus Semicarbazid aus Thiosemikarbazonen abgespalten wird (persönliche Mitteilung von L. Heilmeyer). Damit ist die Möglichkeit einer direkten Beeinflussung der Histaminaseaktivität gegeben, da Semicarbazid die histaminolytische Kraft des Serums hemmt.

Diese Beobachtung gibt uns einen wertvollen Hinweis für die Deutung unserer Befunde. Das Semicarbacid, den Girardschen Carbonylgruppenreagentien zugehörend, kann mit der Histaminase, die eine entsprechend reaktionsfähige Carboxylgruppe enthält, in Verbindung treten. Im Organismus dürften aber sicher mehr Möglichkeiten einer solchen Thiosemicarbacidbindung bestehen. Die Schwierigkeit

der Deutung für unsere Befunde liegt darin, daß es zu einem *vorübergehenden* Abfall der Fermentwirksamkeit kommt, die danach wieder etwa auf die Ausgangswerte vor der Behandlung einspielt.

Wir haben oben bereits darauf hingewiesen, daß früher Befunde bei tuberkulösen Meerschweincheninfektionen erhoben wurden, die eine gleiche krisenhafte, vorübergehende Hemmung zeigten. Wir möchten in diesem Zusammenhang weiterhin auf die Beobachtung *Me.* in Abb. 3 hinweisen. Bei dem Patienten kam es 5 Tage nach Beginn der TB I-Behandlung zu einem Histaminasesturz und folgendem Wiederanstieg; später wurde eine zweite ähnliche Depression der Fermentaktivität bestimmt. Wir erfuhren, daß er zu dieser Zeit unter TB I-Behandlung einen neuen Krankheitsschub — „Streuung nach links" — erlebte. Der erste Sturz dürfte der Ausdruck der durch die Thiosemicarbazon-Medikation ausgelösten Reaktion sein, der zweite der Ausdruck eines Entzündungsschubes anderer endogener Verursachung. Beide Befunde, das Tierexperiment und die Krankenbeobachtung, sprechen unseres Erachtens dafür, daß die Entzündungsreaktion an sich — im Sinne einer Verstärkung — die Minderung der Fermentaktivität wenigstens mitbedingt.

Zu 2. Zerfallendes Gewebe läßt Histamin- bzw. H-Substanzen frei werden; das gilt auch für das Lungengewebe. Ein nennenswerter Gewebszerfall findet bei der chemotherapeutisch günstig beeinflußten Tuberkulose nicht statt; höchstens eine verstärkte Resorption alten Zerfalls- und Entzündungsmaterials. Am entsprechenden biologischen Modell — Gewebeextrakt — konnten wir nachweisen, daß das Thiosemicarbazon geeignet ist, die H-Substanzfreisetzung durch eine Einwirkung am Gewebsextrakt zu fördern. Die H-Substanzausbeute des Ansatzes ist nach TB VI-Einwirkung größer. Durch Zusatz von Tuberkulin kann dieser Effekt aufgehoben werden. Zur Deutung dieser Wirkungen können wir am ehesten annehmen, daß chemische Affinitäten zwischen den Substanzen bestehen, da eine fermentative Tätigkeit im Extrakt durch Arbeiten bei 0^0 unwahrscheinlich ist. Das Histaminübergewicht bzw. die Histaminasedepression bei unseren Kranken kann teilweise Ausdruck dieser chemischen Einwirkung der Thiosemicarbazone sein. Auch Heilmeyer und Brandner wiesen auf eine chemische Beeinflussung zwischen Tuberkulin und TB I hin.

Zu 3. Mit einer günstigen Beeinflussung eines tuberkulösen Prozesses muß eine erhöhte Resorption von Entzündungsprodukten einhergehen, die wechselnd reich an tuberkulinartigen Substanzen sind. Die Bedeutung dieser Autotuberkulinisierung, wobei bei einer Herdreinigung bzw. Sanierung unspezifisch-sensibilisierende Gewebsabbauprodukte hinzukommen, ist dem Tuberkulosearzt aus Erfahrungen bei der Pneumothoraxbehandlung (ausgedehnte frische Prozesse!) und nach anderen Kollapsmaßnahmen bekannt. Sie spielt sicher auch bei der Thiosemicarbazonbehandlung, wenigstens der ausgedehnteren, frischen Prozesse, eine Rolle; gerade bei solchen Kranken wurden am ehesten „allergische" Erscheinungen gesehen. Dazu kommt eine erhöhte Endotoxineinschwemmung aus vermehrt zerfallenden Tuberkulosebakterien. Wenn auch die Thiosemicarbazone bakteriostatisch wirken, so dürfen die keimvernichtenden

Kräfte des Organismus nicht vergessen werden, die im Augenblick der Hemmung der Erregervitalität ins Übergewicht kommen und verstärkt wirksam werden; z. B. Histiozytenmobilisation (Domagk). Unsere Experimente über die Beziehungen zwischen TB VI und Tuberkulin ließen erkennen, daß eine günstige Einwirkung des Medikamentes auf diese mögliche Autosensibilisierung mit tuberkulinartigen Substanzen bestehen kann. Wir konnten zeigen, daß sich der Tuberkulineffekt am biologischen Modell — im Organextrakt bei 37° eine H-Substanzinaktivierung auszulösen — durch TB VI bei der Austestung am Darmpräparat aufheben läßt (s. oben). Einen Teil des günstigen Medikamenteinflusses können wir demnach vielleicht der „entgiftenden" Wirkung auf die Tuberkulinsubstanzen zuschreiben. Ob die Einwirkung direkt erfolgt oder eine sekundäre ist, bleibt offen. Sie ist sicher nicht allein verantwortlich für die gelegentlich beobachtete Abschwächung oder das Verschwinden der Tuberkulinempfindlichkeit (Klee); sie kehrt nämlich zurück, während sie als alleiniger Ausdruck einer chemischen Wirkung zwischen Thiosemicarbazon und Tuberkulinsubstanzen während der Behandlung sich eher zunehmend abschwächen müßte oder nicht mehr wiederkehren dürfte.

Zu 4. Es deutet vieles im klinischen Bild und nach den Ergebnissen der Untersuchungen der Bluteiweißkörperbilanz, Senkungsverhalten, Tuberkulinsensibilität u. a. daraufhin, daß die Thiosemicarbazone die immunbiologischen Reaktionen beeinflussen. Es ist unbekannt, auf welchem Wege; wir werden aber daran denken müssen, daß ihre Einflußnahme über das Retikelzellsystem oder vielleicht über nervöse Zentren geht (Klee, Sturm). Es ist möglich, daß über diese Wege allergische Reaktionen mit erhöhter Histamin- bzw. H-Substanzaktivität ausgelöst werden.

Zu 5. Brandner erwägt, ob sich die Thiosemicarbazone als Haptene mit Nahrungsmitteleiweiß zu einem antigen wirksamen Körper vereinigen und auf diese Weise sensibilisierend wirken.

Die vorangehenden kurzen Diskussionen der möglichen Deutungen des Verhaltens des Histamin-Histaminasesystemes im Verlauf der Thiosemicarbazonbehandlung der Lungentuberkulose zeigen eine Reihe von Problemen auf. Diesen offenen Fragen stehen nur wenige gesicherte Tatsachen gegenüber. Das sind die bakteriostatische Wirkung des Medikamentes mit entsprechender günstiger Beeinflussung einer großen Zahl tuberkulöser Krankheitsprozesse, die entgiftende Wirkung auf Alttuberkulin und seine Fähigkeit, die Histaminbildung in Gewebsextrakten zu fördern. Der Klinik steht heute schon ein beträchtliches Erfahrungsgut zur Verfügung; dazu gehört die günstige Beeinflussung der im Laufe der Behandlung auftretenden Überempfindlichkeitsreaktionen durch Antihistaminika. Wir glauben, in der erhöhten Histaminaktivität, bestimmt

als Histaminasedepression, eine Erklärung gegeben zu haben. Die Überempfindlichkeit macht sich aber nicht nur mit den erwähnten Hauterscheinungen usw. bemerkbar, wir müssen annehmen, daß entsprechende Reaktionen — Entzündungsförderung → evtl. Verkäsung → evtl. Einschmelzung — auch am Krankheitsherd ablaufen. Die Entzündungsförderung ist für einen Teil der Patienten in wechselndem Maße erwünscht, die Verkäsung und Einschmelzung nie. Es wird der subtilen ärztlichen Beobachtung bedürfen, diese sicher zum Teil durch Histamin- bzw. H-Substanzenwirksamkeit ausgelösten Reaktionen gelegentlich als heilsam zu fördern, aber evtl. auch als katastrophal zu dämpfen oder zu unterbinden. Die Thiosemicarbazonwirkung ist sicher eine komplexe (s. Einleitung), und wir werden noch viel Erfahrungsgut sammeln und experimentelle Arbeit leisten müssen, bis wir ihren Segen ganz ausschöpfen und ihre Gefahren vermeiden können.

Zusammenfassung.

1. Es wird einleitend bestätigt, daß das Normalblut eine regelmäßige, statistisch zu sichernde, histaminolytische Fähigkeit hat, im Gegensatz zu einer neueren Mitteilung von Anrep, Barsoum und Ibrahim.

2. Die Bluthistaminase, die beim Tuberkulösen erniedrigt ist, erfuhr in 14 Fällen bei der Thiosemicarbazonbehandlung während der ersten 3 bis etwa 14 Behandlungstage eine krisenhafte Depression. Weniger oft — bei 4 Kranken — ist die Kurve der Bluthistaminase im Anfang der Behandlung schwankend, wenig beeinflußt oder sie zeigt evtl. einen umgekehrten Verlauf.

3. Die Histaminasedepression fällt zeitlich mit den von verschiedenen Autoren bei Thiosemicarbazonmedikation beschriebenen Überempfindlichkeitserscheinungen bei einem Teil ihrer behandelten Tuberkulösen zusammen.

4. Die Histaminasebefunde lassen sich weitgehend mit dem Tuberkuloseverlauf vergleichen, d. h. sie sind prognostisch verwertbar. Sinkt die Fermentaktivität früh ab, so liegen günstig reagierende Erkrankungen vor. Ein Absinken nach langdauernder Behandlung ist als prognostisch ungünstig zu werten oder bedeutet eine vorübergehende Belastung der Prognose: frischer Schub, Pleuritis usw.

5. Die möglichen Ursachen der Änderungen im Histamin-Histaminasesystem während der Thiosemikarbazonbehandlung werden diskutiert.

6. Im Gegensatz zu den Girardschen Carbonylgruppenreagentien wie Semicarbazid zeigen die Thiosemicarbazone erst bei hoher Dosierung eine Hemmung der Histaminolyse. Die soeben von I. Heilmeyer nachgewiesene Abspaltung von Semicarbazid aus Thiosemicarbazon im Organismus macht die direkte Histaminasehemmung möglich.

7. Es wird im Modellversuch nachgewiesen, daß die Histaminentstehung im Gewebsextrakt durch TB VI, wahrscheinlich ohne fermentative Einwirkung, gefördert wird.

8. Es wird experimentell nachgewiesen, daß eine Affinität zwischen Tuberkulin und TB VI besteht. Reproduzierbare Wirkungen von getrennt einwirkendem Tuberkulin und TB VI im Modellversuch heben sich bei gleichzeitiger Einwirkung auf.

9. Das TB VI hat in den von uns verwendeten Konzentrationen keine Eigenwirkung auf den atropinisierten Meerschweinchendarm. Erst bei bedeutend höheren Konzentrationen, die chemotherapeutisch nicht erreicht werden, ist eine reversible Abschwächung der Darmkontraktilität nachweisbar. Eine geringe Kontraktion des Darmes auf TB VI geht der nachfolgenden verminderten Reaktionsbereitschaft auf Histamin voraus.

Literatur.

[1] Werle u. Koch: Beitr. Klin. Tbk. **96**, 584 (1941); **101**, 151 (1948). — [2] Brandner: Dtsch. med. Wschr. **29/30**, 926 (1949). — [3] Heilmeyer: Klin. Wschr. **41/42**, 649 (1948); Dtsch. med. Wschr. **6**, 161 (1949). — [4] Klee: Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. Wiesbaden 1949; in Domagk: Die Tuberkulose, in Druck. — [5] Pribilla u. Köster: Dtsch. med. Wschr. **25**, 795 (1949). — [6] Sturm: Dtsch. med. Wschr. **23**, 726 (1949). — [7] Stüttgen: Arch. Dermat. u. Syphilis **188**, 297 (1949). — [8] Domagk: Beitr. Klin. Tbk. **101**, 365 (1948); Pathologische Anatomie und Chemotherapie der Infektionskrankheiten. G. Thieme, Stuttgart 1947. — [9] Anrep, Barsoum u. Ibrahim: J. Physiol. **106**, 379 (1947). — [10] Westphal. M.: Beziehungen zwischen Bluthistaminaseaktivität und allgemeinbiologischem Status bei Tuberkulose. I. D. Düsseldorf 1941. — [11] Schweitzer, H.: Zur Aktivität der Bluthistaminase bei verschiedenen Infektionskrankheiten und Beziehungen des Histamin-Histaminasekomplexes zum Allergieproblem. I. D. Düsseldorf 1943. — [12] Geks, E.: Die Aktivität der Bluthistaminase bei Tuberkulose. I. D. Düsseldorf 1944. — [13] Holtz, P.: Klin. Wschr. **1937**, 1561. — [14] Werle: Biochem. Z. **291**, 105 (1937); **304**, 201 (1940). — [15] Schreus u. Stüttgen: unveröffentlichte Versuche. — [16] Heilmeyer, I.: persönliche Mitteilung.

Prof. Dr. O. Koch, Düsseldorf, Moorenstr. 5.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 424—430 (1950).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik, Freiburg i. Br.
(Direktor: Professor Dr. Ludwig Heilmeyer).

Quantitative Bestimmung kleiner Mengen von Benzaldehydthiosemicarbazon und dessen Derivaten (TB I 698) in Körperflüssigkeiten.

(1. Mitteilung: Methodik.)

Von

Ingeborg und Ludwig Heilmeyer.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 25. Dezember 1949.)

Es war bisher mangels geeigneter Methodik nicht möglich, die Resorptions- und Ausscheidungsverhältnisse des Benzaldehydthiosemicarbazonderivats TB I 698 (Conteben), das in der Behandlung verschiedener Tuberkuloseformen beachtenswerte Resultate ergeben hat, sowie seine Konzentration im Serum bei verschiedener Dosierung zu studieren. Im folgenden soll die Methodik, die wir zur Untersuchung dieser Fragen angewandt haben, angegeben werden. Das Prinzip ist folgendes[1]:

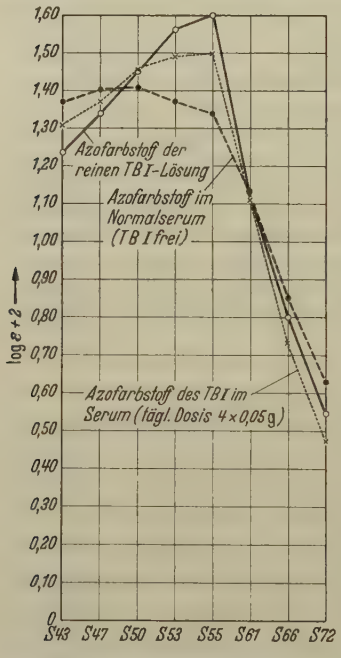


Abb. 1. Typische Farbkurven des Azofarbstoffs der reinen TbI-Lösung verglichen mit dem Azofarbstoff aus TbI-haltigem Serum und TbI-freien Serums im Amylalkohol. Man erkennt den Einfluß störender Substanzen im Serum.

Das Azetylaminobenzaldehydthiosemicarbazon wird mit Toluolsulfonsäure unter Erhitzen im Wasserbad gespalten, dadurch die aromatische Aminogruppe freigemacht und durch Diazotieren mit N(1-Naphthyl)äthylendiaminhydrochlorid in saurer Lösung zu einem roten Azofarbstoff gekuppelt. Da jedoch die Mengen bei der üblichen Dosierung des TB I im Serum und in anderen Körperflüssigkeiten außerordentlich gering sind uud außerdem in den Körperflüssigkeiten stets kleine Mengen anderer

[1] Für die chemischen Vorarbeiten sind wir Herrn Dr. Ragatz, Bern, zu Dank verpflichtet

mit dieser Methode Farbstoff liefernde Substanzen vorkommen, ist es nicht möglich, den erhaltenen Azofarbstoff einfach kolorimetrisch zu bestimmen. Es mußten deshalb neue Wege beschritten werden. Dazu diente die Amylalkoholextraktion des erhaltenen Farbstoffs. Aber auch im Amylalkoholextrakt ist der extrahierte Farbstoff noch stark durch andere bei der Reaktion entstehende Farbstoffe verunreinigt, wie Abb. 1 zeigt, so daß eine einfache kolorimetrische oder photometrische Bestimmung nicht möglich ist. Dagegen gelang die Bestimmung auf dem Wege der Differenzspektrophotometrie in 2 verschiedenen Spektralbezirken in folgender Weise: Wie aus Abb. 1 zu ersehen, zeigt der gefärbte Amylalkoholextrakt eines diazotierten TB I-freien Serums und ebenso bei anderen Körperflüssigkeiten im Spektralbereich des Filters von S 43 des Pulfrich-Photometers eine Extinktion, die etwas höher liegt als im

Tabelle 1.

Serum (TB I-frei)	Werte für E (S 55) − E (S 43)	Harn TB I-frei	Werte für E (S 55) − E (S 43)	Exsudat TB I-frei	Werte für E (S 55) − E (S 43)
1	— 0,046	1	— 0,030	1	— 0,023
2	— 0,021	2	— 0,013	2	— 0,020
3	— 0,022	3	— 0,006	3	— 0,049
4	— 0,060	4	— 0,004	4	— 0,026
5	— 0,047	5	— 0,036	5	— 0,021
6	— 0,025	6	— 0,026	6	— 0,039
7	— 0,018	7	— 0,016	Im Mittel:	— 0,030
8	— 0,022	8	— 0,023		
9	— 0,008	9	— 0,022		
10	— 0,045	10	— 0,026		
11	— 0,004	11	— 0,006		
12	— 0,028	12	— 0,030		
13	— 0,050	13	— 0,011		
14	— 0,029	14	— 0,018		
15	— 0,020	15	— 0,005		
16	— 0,038	16	— 0,022		
17	— 0,025	17	— 0,014		
18	— 0,032	18	— 0,017		
19	— 0,020	Im Mittel:	— 0,018		
20	— 0,023				
21	— 0,025				
22	— 0,033				
Im Mittel:	— 0,029				

Spektralgebiet des Filters S 55. Der Wert der Differenz E (S 55)—E (S43) ist also negativ. In Tab. 1 sind die von verschiedenen TB I-freien Serum-, Exsudat- und Harnproben bei Einhaltung der unten angegebenen Arbeitsvorschrift erhaltenen Werte für diese Differenz angegeben.

In allen Fällen ist diese Differenz negativ und die Werte sind sehr klein. Fügt man zu den angegebenen Körperflüssigkeiten auch nur kleinste Mengen von TB I, so wird diese Differenz positiv. Der TB I-Gehalt errechnet sich dann nach folgender Formel:

$$[(E_{t\ S55} - E_{t\ S43}) - (E_{s\ S55} - E_{s\ S43})] \cdot K = \text{mg TB I in 100 cm}^3.$$

Worin $E_{t\ S55}$ und $E_{t\ S43}$ die Extinktionen bei Filter S 55 und S 43 bei 1 cm Schichtdicke des diazotierten TB I-Serums im Amylalkoholextrakt und $E_{s\ S55}$ und $E_{s\ S43}$ die entsprechenden Extinktionen des Amylalkoholextraktes des TB I-freien Serums oder einer anderen Körperflüssigkeit bedeutet.

Arbeitsvorschrift.

a) Für Serum (ebenso für Exsudat und Empyem).

1 cm³ Serum,
+ 5 cm³ aqua dest.,
+ 4 cm³ p-Toluolsulfonsäure (Reagenz 1)

werden in ein Reagenzglas gegeben und ½ Std im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen wird filtriert.

Nach Abkühlen im Eiswasser wird mit im Eiswasser vorgekühlten Reagentien diazotiert:

5 cm³ Filtrat
+ 1 cm³ Natriumnitrit (Reagenz 2) genau 5 min warten!
+ 1 cm³ Sulfaminsäure (Reagenz 3) 3 min warten, nach jedem Zusatz gut umschütteln!
+ 1 cm³ Kupplungssubstanz (Reagenz 4).

Nach 5—15 min wird die Gesamtmenge der erhaltenen gefärbten Lösung mit 2,5 cm³ Amylalkohol in einem Schütteltrichter 2 min lang ausgeschüttelt. Nach Absetzen wird die wäßrige Lösung abgelassen. Zur Klärung des Amylalkohols werden 4—5 Tropfen Methylalkohol zugegeben und das Ganze bei ½ cm Schicht photometriert. Stehen Kleinküvetten zur Verfügung, so ist es ratsam, bei 1 cm Schicht zu photometrieren. (Bei 0,5 cm Schicht müssen die erhaltenen Werte mit 2 multipliziert werden.) Der Fehler, der durch geringe Trübungen entsteht, wird durch die Differenzmethode von selbst ausgeschaltet. Es ist auf peinlichste Sauberkeit der verwendeten Gläser und Reagentien zu achten, da schon Spuren von Verunreinigungen die Bestimmung unmöglich machen. Am besten werden die Gläser mit Chromschwefelsäure und Aqua dest. gereinigt.

Reagentien, die für die Bestimmung benötigt werden:

Reagenz 1: p-Toluolsulfonsäure: 20%ige wäßrige Lösung
Reagenz 2: Natriumnitrit 0,1% wäßrige Lösung
Reagenz 3: Sulfaminsäure 0,5% wäßrige Lösung
Reagenz 4: N(1-Napthyl)-äthylendiamindihydrochlorid 0,1%.

b) Für Urin.

2 cm³ Toluolsulfonsäure werden im Reagenzglas mit 4 cm³ aqua dest. verdünnt und 1 cm³ 1:20 verdünnter Urin zugegeben und ½ Std im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen in Eiswasser wird der gesamte Ansatz (7 cm³ + 1 cm³ R_2 + 1 cm³ R_3 + 1 cm³ R_4) diazotiert genau in der gleichen Weise wie es oben für Serum beschrieben wurde. Ausschütteln mit 2,5 cm³ Amylalkohol und Ablesen im Stufenphotometer wie beim Serum.

Bestimmung der Konstanten K.

Es wurden TB I-Testlösungen verschiedener Konzentration, bei denen sich der TB I-Gehalt zwischen 0,1—1,0 mg auf 100 cm³ bewegte, nach folgendem Lösungsverfahren hergestellt:

TB I	10 mg
1 n NaOH	0,1 cm³
Abs. Alkohol	8,0 cm³
Aq. dest. ad	100,0 cm³.

Aus dieser Standardlösung wurden die entsprechenden weiteren Verdünnungen mit Wasser hergestellt. Ein zweites Verfahren bestand darin das TB I mit Antipyrin in Lösung zu bringen, wie es zur intravenösen Verabreichung in Anwendung kommt. Tab. 2 zeigt die bei verschiedenen TB I-Konzentrationen erhaltenen Werte für $[(E_{t\ S55} - E_{t\ S43}) - (E_{s\ S55} - E_{s\ S43})]$ und dieselben umgerechnet auf eine Konzentration von 1 mg auf 100 cm³.

Der Mittelwert für 1/K beträgt nach der Tabelle 2 0,40, daraus errechnet sich der Wert von K zu 2,5. Dieser Wert gilt für die Errechnung der TB I-Konzentration in Serum, Exsudat und Empyem. Beim Urin ist die Gesamtverdünnung 10 mal größer als beim Serum, die Konstante K_U beträgt demnach 25.

Aus der obigen Tabelle ergibt sich für die mittlere quadratische Abweichung ein Wert von $\sigma = 0{,}038$. Der Fehler des Mittelwertes beträgt 0,007.

Die Ergebnisse sind im Hinblick auf die Schwierigkeit der Methodik und im Hinblick auf die schwierigen Löslichkeitsverhältnisse des TB I befriedigend.

Tabelle 2.

Nr.	TB I Konzentration der Testlösung	Abgelesener Wert für $[(E_t\ s_{55} - E_t\ s_{43}) - (E_s\ s_{55} - E_s\ s_{43})]$	Errechneter Wert für eine Konzentration von 1 mg/100 cm³ $\left(= \frac{1}{K}\right)$
1	0,2 mg%	0,078	0,39
2	0,4 mg%	0,146	0,365
3	0,5 mg%	0,174	0,35
4	0,6 mg%	0,230	0,38
5	0,8 mg%	0,288	0,36
6	1,0 mg%	0,372	0,37
7	0,2 mg%	0,084	0,42
8	0,5 mg%	0,214	0,43
9	0,8 mg%	0,352	0,44
10	1,0 mg%	0,436	0,44
11	0,4 mo%	0,146	0,36
12	0,5 mg%	0,189	0,38
13	0,8 mg%	0,264	0,33
14	1,0 mg%	0,406	0,41
15	0,2 mg%	0,080	0,40
16	0,4 mg%	0,152	0,38
17	0,5 mg%	0,196	0,39
18	0,8 mg%	0,315	0,39
19	1,0 mg%	0,360	0,36
20	0,5 mg%	0,174	0,35
21	0,8 mg%	0,272	0,34
22	0,1 mg%	0,040	0,40
23	0,5 mg%	0,214	0,43
24	0,7 mg%	0,324	0,46
25	0,8 mg%	0,362	0,45
26	0,9 mg%	0,396	0,44
27	1,0 mg%	0,460	0,46
28	0,5 mg%	0,232	0,46
29	0,1 mg%	0,040	0,40
30	0,3 mg%	0,128	0,43
		Im Mittel:	0,40

Prüfung der Methodik auf ihre Brauchbarkeit.

Im folgenden werden Zusätze von TB I zu TB I freiem Normalserum und TB I-freiem Urin gemacht in der gleichen Konzentration wie bei den Testlösungen und mittels des vorher ermittelten Faktors die TB I-Konzentration errechnet. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen Tab. 3 und Tab. 4.

Die zugesetzten TB I-Mengen werden sowohl im Serum wie im Harn wiedergefunden. Ein nennenswerter systematischer Fehler ist nicht vorhanden wie aus der Errechnung der Durchschnittswerte hervorgeht. Dagegen muß mit einer Streubreite der Methodik bis zu 17% gerechnet werden. Hierzu muß aber bemerkt werden, daß mangels Mikroküvetten

die Ablesung nur in $\frac{1}{2}$ cm Schicht vorgenommen werden konnte, was die Streubreite erheblich vergrößert. Bei unseren klinischen Untersuchungen haben wir außerdem immer Doppelbestimmungen durchgeführt, was die Fehlerstreuung weiter einengt. Im übrigen ist aber auch die oben festgestellte Genauigkeit der Methodik besonders im Hinblick auf die erhaltenen sehr niedrigen TB I-Konzentrationen im Serum und anderen Körperflüssigkeiten für klinische Zwecke durchaus genügend. Nach Möglichkeit sollte vor der TB I-Verabreichung der Leerwert des Serums oder anderer Körperflüssigkeiten bestimmt werden und dieser Wert wie in der obigen Formel angegeben in Abzug gebracht werden. Dies wird jedoch nicht in allen Fällen möglich sein und so kann man ohne größeren Fehler den mittleren Wert für $(E_s\ s_{55} - E_s\ s_{43})$ entsprechend dem Mittelwert der Tab. 1 für Serum und Exsudat mit 0,03, für Harn mit 0,02 einsetzen. Selbstverständlich ist die Methodik nur anwendbar, wenn keinerlei Medikamente, die durch Diazotieren Azofarbstoffe liefern, gegeben werden, sie ist auch nicht anwendbar bei Urämie und Ikterus.

Die mit der mitgeteilten Methode erzielten Ergebnisse am Menschen werden in der folgenden 2. Mitteilung veröffentlicht.

Tabelle 3.

Lfd. Nr.	Errechneter TB I Gehalt des Serums	Abgelesener Wert für $[(E_t\ s_{55} - E_t\ s_{43}) - (E_s\ s_{55} - E_s\ s_{43})]$	Gefundener TB I Gehalt des Serums.	Prozentuale Abweichung
1	0,25 mg%	0,106	0,265 mg%	+ 6,0%
2	0,5 mg%	0,231	0,578 mg%	+15,6%
3	0,2 mg%	0,094	0,235 mg%	+17,5%
4	0,5 mg%	0,206	0,515 mg%	+ 3,0%
5	0,8 mg%	0,432	0,855 mg%	+ 6,9%
6	1,0 mg%	0,408	1,020 mg%	+ 2,0%
7	0,2 mg%	0,086	0,215 mg%	+ 7,5%
8	0,6 mg%	0,270	0,675 mg%	+12,5%
9	0,2 mg%	0,092	0,230 mg%	+15,0%
10	0,4 mg%	0,164	0,410 mg%	+ 2,5%
11	0,6 mg%	0,266	0,665 mg%	+10,8%
12	0,8 mg%	0,346	0,865 mg%	+ 8,1%
13	0,2 mg%	0,086	0,215 mg%	+ 7,5%
14	1,0 mg%	0,398	0,995 mg%	— 0,5%
15	2,0 mg%	0,850	2,125 mg%	+ 6,3%
16	0,1 mg%	0,044	0,110 mg%	+10,0%
17	0,2 mg%	0,075	0,188 mg%	— 6,0%
18	0,3 mg%	0,143	0,358 mg%	+19,2%
19	0,5 mg%	0,201	0,503 mg%	+ 0,6%
20	0,6 mg%	0,231	0,578 mg%	— 3,7%
21	0,1 mg%	0,037	0,093 mg%	— 7,0%
22	0,7 mg%	0,262	0,655 mg%	— 6,4%
Im Mittel:	0,534 mg%		0,561 mg%	+ 5,1%

Tabelle 4.

Lfd. Nr.	Errechneter TB I Gehalt des Harns	Abgelesener Wert für $[(E_t\ s_{55} - E_t\ s_{43}) - (E_s\ s_{55} - E_s\ s_{43})]$	Gefundener TB I Gehalt des Harns	Prozentuale Abweichung
1	4 mg%	0,146	3,65 mg%	— 8,8%
2	5 mg%	0,168	4,20 mg%	—16,0%
3	8 mg%	0,340	8,50 mg%	+ 6,3%
4	10 mg%	0,408	10,20 mg%	+ 2,0%
5	20 mg%	0,700	17,50 mg%	—12,5%
6	1 mg%	0,036	0,90 mg%	—10,0%
7	10 mg%	0,440	11,00 mg%	+10,0%
8	4 mg%	0,138	3,45 mg%	—13,8%
9	2 mg%	0,072	1,80 mg%	—10,0%
10	4 mg%	0,166	4,15 mg%	+ 3,8%
11	8 mg%	0,342	8,55 mg%	+ 6,9%
12	10 mg%	0,420	10,50 mg%	+ 5,0%
13	4 mg%	0,184	4,60 mg%	+15,0%
14	8 mg%	0,284	7,10 mg%	—11,3%
15	10 mg%	0,380	9,50 mg%	— 5,0%
16	16 mg%	0,692	14,95 mg%	— 6,6%
17	20 mg%	0,840	21,00 mg%	+ 5,0%
19	15 mg%	0,692	17,30 mg%	+15,3%
20	4 mg%	0,146	3,65 mg%	— 8,8%
21	2 mg%	0,074	1,85 mg%	— 7,5%
22	10 mg%	0,372	9,30 mg%	— 7,0%
Im Mittel:	8,4 mg%		8,36 mg%	— 0,5%

Dr. Ingeborg Heilmeyer, Freiburg/Br., Medizin. Universitätsklinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 431—436 (1950).

Aus der Hautklinik der Medizinischen Akademie Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. H. Th. Schreus).

Der Blutserumspiegel des Marfanils nach oraler Verabreichung.

Von
Günter Stüttgen.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 24. Januar 1940.)

Die chemotherapeutische Wirkung einer bakteriostatischen Substanz ist von der Höhe des Blutspiegels und von der Dauer der Einhaltung des bakteriostatisch wirksamen Spiegels abhängig.

Marfanil zeigt in vitro wie auch bei lokaler Anwendung in vivo eine besonders gute Wirkung gegen Anaerobier, wie den Fränkelschen Gasbrandbacillus und Pararauschbrand, ohne daß bei oraler oder parenteraler Applikation dieser Substanz ein Vorzug gegenüber den Sulfanilamiden zu beobachten wäre. Im Gegenteil fanden Schreus und Mitarbeiter, daß Sulfanilamide bestimmter Konstitutionen bei der Gasbrandinfektion des Meerschweinchens wirksamer als Marfanil waren. Weiterhin sagen auch Hartless und Williams dem Marfanil im allgemeinen bei oraler Gabe keine besondere bakteriostatische Wirkung bei Anaerobiern nach.

Es lag nahe, dieses Phänomen einerseits auf die große Wasserlöslichkeit des Marfanils und die damit verbundene schnelle Ausscheidung (Schreus 1941), und andererseits auf einen Umbau des Marfanils im Organismus in eine bakteriostatisch unwirksame Substanz zu beziehen.

In dieser Richtung war eine Beziehung zwischen Aminoxydase und Marfanil schon von Beyer und Govier wie auch von Blaschko und Duthie aufgedeckt worden. Bei oraler Gabe des Marfanils bei der Ratte wiesen Hartless und Williams im Urin p-Benzoesäuresulfonamid nach. Sie fanden im Urin diese Substanz in einer Menge, die etwa 84% des verabreichten Marfanils entsprach; das bedeutet, daß im Urin wahrscheinlich das Endprodukt einer Marfaniloxydation über einen Aldehyd durch die Aminoxydase vorliegt. p-Benzoesäuresulfonamid ist nach den genannten Autoren ohne bakteriostatische Wirkung.

Schreus und Stüttgen fanden, daß Marfanil als Hemmsubstanz der Histamininaktivierung wirkt, und zwar sowohl in seiner direkten Wirkung am isolierten Darmpräparat, als auch in seiner Beeinflussung des fermentativen Abbaus des Histamins in gereinigten Fermentaufarbeitungen.

Es lag nahe, den Wirkungsmechanismus des Marfanils über eine Beeinflussung des Histaminstoffwechsels zu vermuten, zumal dieser bei Pararauschbrand und Fränkelschem Gasbrandbazillus eine Rolle spielt (Werle und Ehrismann). Tatsächlich fanden Schreus und Stüttgen eine Hemmung des Anaerobierwachstums durch das Diamin Putrescin (bei 50fach höherer Konzentration als Marfanil),

das ebenfalls ein wirksamer Hemmkörper des Histaminabbaus ist. Eine obligate zellschädigende Wirkung der Diamine, besonders des Putrescins, wurde an einem Staphylokokkenstamm ausgeschlossen.

Mit seiner aliphatischen Aminogruppe gibt Marfanil eine Reaktion mit NESSLERS Reagens (Merck), und zwar bei gleichen quantitativen Verhältnissen im alkalischen Milieu wie die Substrate der Diaminoxydase. Diese Trübungsreaktion ist so empfindlich, daß sie uns als geeignet erscheint, Marfanil quantitativ im Blut beim Menschen nachzuweisen.

Eine Farbreaktion des Marfanils mit Dinitrobenzaldehyd, die von HARTLESS und WILLIAMS angegeben wurde, benutzten diese Autoren nur, um Marfanil nach oraler Gabe bei der Ratte im Urin auszuschließen. Blutserumspiegelbestimmungen wurden noch nicht ausgeführt.

Nach orientierenden Versuchen kamen wir zu folgendem Nachweis des Marfanils im Blutserum: Serumfiltrat gibt mit NESSLERS Reagens einen Niederschlag, der bei Zugabe von Marfanil seine Farbe im Sinne einer Verschiebung ins Weiße deutlich ändert. Diese Farbänderung ist als annähernde quantitative Bestimmung des Marfanils geeignet.

Wir verwandten zur Gewinnung eines einwandfreien Serumfiltrats die Fällung mit 20%iger Trichloressigsäure, oder mit gesättigter Na-Sulfatlösung. Bei den Versuchen in vitro benutzten wir Marfanil in Reinsubstanz (Bayer), bei den Belastungsversuchen am Menschen Marfanil oral in Form von Mesudin-Tabletten der Firma Bayer.

Methode a) Trichloressigsäurefällung. 4,0 cm³ Serum + 12,0 cm³ Wasser + 4,0 cm³ 20%iger Trichloressigsäure. Nach Gewinnung eines vollkommen klaren Filtrats wurde dies durch Verdampfen auf 1,5 cm³ eingeengt, mit 0,1 cm³ 20%iger Kalilauge versetzt und bei Zimmertemperatur 0,15 cm³ NESSLERS Reagens zugegeben. Zusätze von Marfanil zum Serum vor der Trichloressigsäure zeigten, daß sich Marfanil im Rückstand nach Verdampfung quantitativ wiederfinden läßt. Die Farbintensität des Niederschlags nach Zusatz von NESSLERS Reagens entspricht der Menge des zugesetzten Marfanils (Tab. 1).

Tabelle 1. *In vitro-Versuche von Marfanilbestimmungen unter Zugabe der angegebenen Menge Marfanil-Reinsubstanz (Bayer) vor Fällung mit 20%iger Trichloressigsäure.*

Serum Pat. A	Marfanilzusatz	Farbe des Niederschlg.
Serum Pat. A	Marfanil-zusatz	Farbe des Niederschlags
4,0 cm³	—	orange-braun
4,0 cm³	30 γ	orange
4,0 cm³	50 γ	orange-gelb
4,0 cm³	100 γ	gelb
4,0 cm³	200 γ	weiß-gelb
4,0 cm³	500 γ	weiß

Aufarbeitung nach im Text angegebener Methodik.

Empfindlichkeitsgrenze: Die Farbreaktion im Serumfiltrat war erst bei Zusatz von 30—50 Gamma Marfanil pro 4,0 cm³ Serum einwandfrei erkennbar; außerhalb der Fehlerbreite der Methode stand also ein Marfanilspiegel von 1,0 mg%. Da der praktisch erzielbare Marfanilspiegel kaum 1,0 mg% betrug, sind geringere Serummengen als 4,0 cm³ für die Methode des Marfanilnachweises in vivo nicht zu gebrauchen.

Wir belasteten Patienten in nüchternem Zustand mit 4,0 g Marfanil und bestimmten in den auf Abb. 1 angegebenen Zeitabständen den Marfanilspiegel im Serum. Wichtig war, daß von jedem Serum eine Kontrollserie mit Marfanilzusätzen angesetzt wurde, da die Farbtonänderungen des Serums des einen Patienten sich nicht immer mit denen eines anderen Patienten vergleichen ließen.

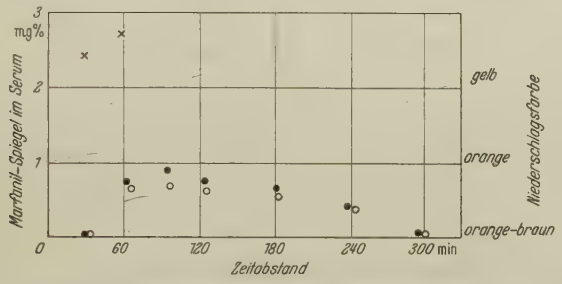


Abb. 1. Der Marfanil-Serumspiegel in mg% nach oraler Belastung mit 4 g Marfanil. •○ = gefundene Werte in angegebenem Zeitabstand (Werte von zwei gesunden Patienten im Alter von 18 und 26 Jahren). × = Serumkontrolle der gleichen Versuchspersonen mit Zusatz von 100 Gamma Marfanil-Reinsubstanz. Methodik der Trichloressigsäurefällung. Die Werte der Ordinate wurden durch mehrfache Kontrollansätze mit Marfanilzusatz zum Serum ausgetestet. Die Farbunterschiede sind in diesem Bereich zwar gering, aber noch erkennbar.

Methode b) Natriumsulfatfällung. Man kann der Eiweißfällung mit Trichloressigsäure und dem nachfolgenden Verdampfen den Einwand machen, daß durch Erhitzung des Trichloressigsäurefiltrats mit Marfanil spontane chemische Umsetzungen an diesem eintreten, und daß sich auf diese Weise Marfanil dem Nachweis mit Nesslers Reagens entziehen könnte. Kontrollen mit azetyliertem Marfanil

ergaben z. B. keine Reaktion mit Nesslers Reagens. Aus diesem Grunde gingen wir zu der schonenderen Methode der Eiweißfällung mit gesättigter Na-Sulfatlösung über: 4,0 cm³ Serum wurden mit 12,0 cm³ gesättigtem Na-Sulfat versetzt. Diese Lösung wurde 10 min lang in kochendem Wasserbad erhitzt, danach filtriert, der Niederschlag über dem Filter mit 10,0 cm³ Aqu. dest. gewaschen und das Filtrat im Erlenmeyer-Kölbchen bis zur Trocknung verdampft. Der Rückstand wurde mit 2,0 cm³ destilliertem Wasser aufgenommen, auf 1,5 cm³ verdampft und weiter verfahren wie oben. Auch hier ergab sich ein quantitativer Nachweis des Marfanils im verdampften Rückstand.

Die Belastung führten wir bei dieser Methode wieder mit 4,0 g Mesudin, diesmal mit 2mal 4,0 im Abstand von 3 Std durch. Über den Ausfall der

Reaktionen gibt Abb. 2 Auskunft. Auch hier wurden für jedes Serum des jeweiligen Patienten Kontrollansätze des gleichen Serums mit Marfanilzusatz angestellt. Zu bemerken ist, daß der Farbton des Niederschlags im Verlaufe von mehreren Stunden nachdunkelt, der Farbunterschied gegenüber den Kontrollansätzen mit Marfanil jedoch deutlich bleibt.

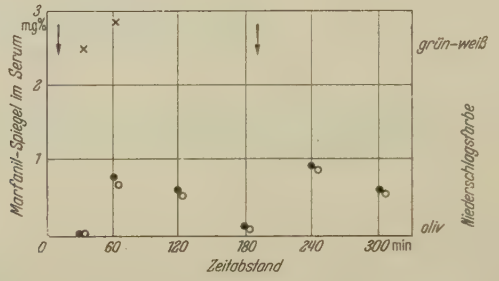


Abb. 2. Der Marfanil-Serumspiegel in mg% nach Belastung mit jeweils 4 g Marfanil oral. •° = gefundene Werte in angegebenem Zeitabstand (Werte von 2 gesunden Patienten im Alter von 19 und 36 Jahren). × = Serumkontrolle der gleichen Versuchspersonen mit Zusatz von 100 Gamma Marfanil-Reinsubstanz. Methodik der Fällung mit Natriumsulfat.

Ergebnisse der Belastungsversuche.

In keinem der oralen Belastungsversuche wurde in den angegebenen Zeitabständen ein Marfanilserumspiegel über 1,0 mg% gefunden. Damit ist keineswegs gesagt, daß die Substanz nicht in irgendeiner *veränderten* Form in die Blutbahn übergeht. Am nächstliegenden ist die Vermutung, daß Marfanil schon während der Resorption durch die Darmwand, wie auch beim Durchströmen der Leber chemisch zu einer Substanz umgewandelt wird, die sich dem Nachweis durch NESSLERS Reagens entzieht. Der Gehalt der Darmwand an Amino- und Diaminoxydase ist besonders hoch. Ob das salzsaure Marfanil (Mesudin) infolge seiner hohen Wasserlöslichkeit so schnell durch die Niere ausgeschieden wird, daß es zu keinem Nachweis des Marfanils in der Fehlerbreite unserer Methode kam, ist ebenfalls zu bedenken. Nach den Befunden von HARTLESS und WILLIAMS scheint uns eine Veränderung des Marfanils im Sinne einer Oxydation über einen Aldehyd zum p-Benzoesäuresulfonamid wahrscheinlicher.

$$NH_2 \cdot SO_2 \cdot C_6H_4 \cdot CH_2 \cdot NH_2 \rightarrow NH_2 \cdot SO_2 \cdot C_6H_4 \cdot CH : NH$$
$$\rightarrow NH_2 \cdot SO_2 \cdot C_6H_4 \cdot CHO \rightarrow NH_2 \cdot SO_2 \cdot C_6H_4 \cdot COOH.$$

Für diesen Weg der Marfanilumwandlung haben wir zwar keinen Beweis gefunden, doch dürfte die bereits erwähnte Beobachtung über die Farbreaktion des Serums nach oraler Belastung mit Marfanil für das Vorkommen eines körperfremden Aldehyds im Serum sprechen, nämlich

das starke Nachdunkeln der Niederschläge des Serumfiltrats im Laufe von 24 Std nach Versetzen mit Nesslers Reagens bei Fällung mit Natriumsulfat.

Vor der Belastung sieht der Niederschlag olivfarben aus, während die Niederschläge im angegebenen Zeitabstand *nach* der Belastung eine ausgesprochene schwarze Verfärbung zeigen, die wohl zum großen Teil auf den Ausfall von molekularem Quecksilber zurückzuführen sein dürfte. Im Kontrollversuch ist nämlich ein ähnlicher Farbumschlag durch geringe Mengen von Benzaldehyd zu erreichen, der über rotes kolloidales Quecksilber zum Ausfall von schwarzem molekularen Quecksilber führt.

Wir hätten somit einen Anhalt dafür, daß die Aldehydvorstufe des von Hartless und Williams gefundene p-Benzoesäuresulfonamid bereits im Serum vorliegt.

Doch könnten natürlich nach einer Marfanilbelastung auch durch andere Substanzen derartige Reaktionen bedingt sein, ohne daß eine Umwandlung des Marfanils zu einem Aldehyd erfolgt. Nach Heidemann und Rutledge, die den Marfanilspiegel im Blut mit Hilfe von U. V.-Spektrographie bestimmten, liegt nach einer einmaligen Belastung von 0,4 g/kg beim Kinde der Marfanil-Blutspiegel um 5 bis 10 mg%. Doch gründet sich der Nachweis mit U.V.-Spektrographie, wie die Autoren selbst bemerken, auf die Sulfamidgruppe; andere Sulfonamide interferieren mit dem Spektrum des Marfanils. Somit ist eine etwaige Umwandlung des Marfanils an der p-ständigen CH_2NH_2-Gruppe im Ultraviolettspektrum vermutlich nicht zu erfassen.

Quantitativ brauchen die Ergebnisse von Heidemann und Rutledge mit unseren im Serum gefundenen Marfanilwerten nicht im Widerspruch zu stehen. Wir haben ca. 70 kg schwere Patienten mit 4,0 g Marfanil in einem Stoß, also entsprechend 0,06 g/kg belastet. Wir fanden einen Blutspiegel von nahezu 1,0 mg%, während die Autoren bei 7fach höherer Dosierung 5—10 mg% erreichten.

Einen Blutspiegel bis zu 35 mg% erzwangen sie mit Dosierungen, die 80 Tabletten Mesudin zu 0,5 g in *einer* Verabreichung entsprechen würden.

Betrachten wir unsere Ergebnisse vom Gesichtspunkt der Chemotherapie aus, so erscheint es uns bedeutsam, daß wir mit der üblichen Dosierung von 0,06 g/kg keinen höheren Blutserumspiegel als 1,0 mg% finden können.

Zusammenfassung.

1. Die Möglichkeit einer Veränderung des Marfanils (Amino- und Diaminoxydase) im intermediären Stoffwechsel wird erörtert.

2. Ein Marfanilnachweis im Serum mit Nesslers Reagens wurde gefunden und entwickelt.

3. Der Marfanil-Blutspiegel beim Menschen erreicht nach oraler Belastung mit einmal oder zweimal im Abstand von 3 Std mit je 4,0 g einen Spiegel von höchstens 1,0 mg%.

4. Es wurden Hinweise gefunden, daß im Serum nach oraler Belastung mit Marfanil eine Oxydationsstufe der Substanz (Aldehyd) vermehrt vorkommt.

Literatur*.

[1] Beyer u. Govier: Science **101**, 150 (1945). — [2] Blaschko u. Duthie: Bioch. Journ. **39**, 347 (1945). — [3] Hartless u. Williams: Bioch. Journ. **41**, 206 (1947). — [4] Heidemann u. Rutledge: J. of Pediatr. **1949**, 33, 274—280. — [5] Schreus u. Pelzer: Kl. Wschr. **529** (1941). — [6] Schreus u. Schümmer: Kl. Wschr. **705** (1941). — [7] Schreus u. Stüttgen: Verhdlg. Westd. Dermatolog. Köln, Mai 1949 u. im Druck. — [8] Werle u. Ehrismann: Bioch. Z. **560** (1948).

* Für die Überlassung von ausländischem Literaturmaterial danke ich der Pharma-Abteilung der Farbenfabriken Bayer-Leverkusen.

Dr. Günter Stüttgen, Düsseldorf, Medizin. Akademie, Hautklinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 437—443 (1950).

Aus dem Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt/Main
(Direktor: Prof. K. Felix. Arbeitsgruppe Prof. O. Riesser).

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf den gegenseitigen Antagonismus von Adrenalin-Adrenochrom und Insulin im Glykogensyntheseversuch am überlebenden isolierten Rattenzwerchfell.

Von
Otto Riesser† und Hansgünter Kahlfeld.

(Eingegangen am 12. Oktober 1949.)

Das überlebende Zwerchfell von Ratten hat sich schon früher in Versuchen von O. Warburg, O. Meyerhof und von Reinwein als sehr geeignet erwiesen zur Messung des Sauerstoffverbrauches unter verschiedenen Bedingungen. Die Dünne des Muskels sicherte eine optimale Sauerstoffversorgung aller Schichten. Daß dies allerdings nur bei den sehr dünnen Zwerchfellen kleiner Tiere (um 100 g) zutrifft, hat neuerdings Ther gezeigt (Habilitationsschrift Frankfurt a. M. 49). Aber erst Gemmill und Mitarbeiter haben bewiesen, daß das gleiche Objekt sich zur Bestimmung eines Synthesevorganges, nämlich der Bildung von Glykogen aus Glukose, ausgezeichnet eignet. Gerade für solche im eigentlichen Sinne vitalen Vorgänge sind 2 Bedingungen maßgebend: Optimale Sauerstoffversorgung und Intaktheit der Zellstruktur. Beides trifft beim überlebenden Zwerchfell zu.

Bringt man solches in ein Gefäß mit Traubenzucker-haltiger Ringerlösung bei 37° C und reichlicher O_2-Versorgung, so bleibt nicht nur die sonst eintretende Glykogenolyse aus, sondern es wird Glykogen über das präformierte hinaus neu gebildet. Am bedeutsamsten ist der Befund Gemmils, daß bei Gegenwart von Insulin die Glykogenbildung erheblich verstärkt wird. Man kann also diese Grundwirkung des Insulins in vitro unter wechselnden Bedingungen studieren. Die Richtigkeit dieser Beobachtung ist seither von vielen anderen Untersuchern regelmäßig bestätigt worden. Z. B. von Hechter, Levine und Soskin, von Riesser und Mitarbeitern, von Stadie und Zapp, Verzár und Wenner, Tuerkischer und Wertheimer sowie von Cori und Mitarbeitern.

Daß Leberschnitte genügender Dünne in vitro Glykogen aus Glukose aufbauen können, war schon durch ältere Versuche, insbesondere von Ostern und Holmes bekannt. Die Bedingungen hierfür sind in neuerer Zeit vor allem von Hastings und Buchanan studiert worden. Sie machten die wichtige Beobachtung, daß die Synthese in Leberschnitten

durch reichlichen Kaliumgehalt begünstigt, ja meistens überhaupt erst ermöglicht wird. Dieses Verhalten der Leberschnitte steht im Gegensatz zum Verhalten des Muskels, der beim Fehlen von Kalium optimal synthetisiert. Besonders Tuerkischer und Wertheimer haben dieses unterschiedliche Verhalten herausgearbeitet. Die Leberzellen synthetisieren also in einem Milieu, wie es für das Zellinnere charakteristisch ist, der Muskel in einer Lösung, die der extrazellulären Flüssigkeit entspricht.

Es ist leicht verständlich, daß die Möglichkeit der Messung eines Synthesevorganges in vitro zu Versuchen über die Abhängigkeit dieses Vitalvorganges von mancherlei Faktoren geradezu herausfordert. Gemmills Insulinversuche gaben hierfür das 1. Beispiel. Riesser fand dann, daß Adrenalin die Glykogenbildung aus Glukose in vitro verhindert und die Wirkung des Insulins aufhebt. Beides war auch dann möglich, wenn die Adrenalinlösung schon vorher ½ Std auf 37° C unter Sauerstoffzufuhr erwärmt wurde, also unter Bedingungen, die eine Oxydation des Adrenalins begünstigen. Tuerkischer und Wertheimer bestätigten die Glykogenolysehemmung durch Adrenalin am Zwerchfell, ohne jedoch den Insulin-Adrenalin-Antagonismus zu untersuchen. In seinen mannigfach variierten Versuchen fand Riesser, daß nicht nur Adrenalin die Wirkung des Insulins, sondern dieses auch die Wirkung des Adrenalins aufhebt. Er zog daraus den Schluß auf eine Reaktion zwischen den beiden Hormonen unter Bildung unwirksamer Produkte. Früher schon hatte Marquardt darüber eine ähnliche Hypothese vertreten.

Um die Annahme zu prüfen, ob etwa Oxydationsprodukte des Adrenalins die eigentliche Ursache seiner Wirkung unter den geschilderten Versuchsbedingungen sind, untersuchten Riesser und Mitarbeiter die Wirkung des Adrenochroms und zeigten, daß es in der Tat die Insulinwirkung ebenso aufhebt wie Adrenalin selbst. Unerwarteterweise aber ergab sich in wiederholt bestätigten Versuchen, daß die Glykogenolysehemmung und Glykogenbildung in Insulin-freien, aber Glukose-haltigen Lösungen durch Adrenochrom nicht beeinflußt wird. Damit wird es unwahrscheinlich oder sogar ausgeschlossen, daß die Adrenalinwirkung im Zwerchfellversuch über die intermediäre Bildung von Adrenochrom geht.

Alle bisherigen Versuche von Riesser und Mitarbeitern waren bei einer relativ sauren Reaktion in Gegenwart von 0,05% primären Phosphats ausgeführt worden. Die Frage stellte sich und wird in den nachstehend dargestellten Versuchen geprüft, wie sich Adrenalin gegenüber der durch Glukose allein sowie der durch Insulin begünstigten Synthese bei weniger saurer oder neutraler Reaktion verhält. Die meisten übrigen Autoren hatten in der Tat bei p_H 7,2—7,4 gearbeitet. Versuche über die Glykogensynthese mit verschiedenem p_H haben schon Stadie und Zapp sowie Tuerkischer und Wertheimer gemacht.

Methodik.

Präparation des Zwerchfelles von 100—140 g schweren Ratten in Form zweier zwischen je einem halben Rippenring ausgespannten Hälften. Je eine Hälfte wurde in einem Glasröhrchen mit 10 cm³ Karbonat-freier Ringer-Lösung nach Lenhartz, der 0,5% Glukose zugesetzt war, frei flottieren lassen. Je nach der gewünschten (H)-Konzentration war der Ringer-Glukose-Lösung 0,1 cm³ einer 5%igen Phosphatmischung der betreffenden Reaktion zugesetzt (Endkonzentration 0,05%). Die Kontrolle des p_H-Wertes erfolgte in allen Fällen elektrometrisch. Die die Zwerchfellhälfte umgebende Lösung wurde aus feinen Glaskanülen dauernd mit Sauerstoff durchperlt und mittels eines Thermostaten auf 37—38° C gehalten. Nach 2stündiger Inkubationszeit wurde die Zwerchfellhälfte am Rippenring aus der Lösung genommen, mit Ringer-Lösung abgespült und vom Rippenring abpräpariert. Nach raschem Abtrocknen auf Filterpapier und Wägung auf der Torsionswaage erfolgte die Auflösung des Zwerchfelles in einem in kochendem Wasserbad stehenden, 10 cm³ fassenden Zentrifugierröhrchen mit 2 cm³ 30%iger Kalilauge. Die Glykogenbestimmung wurde nach den Angaben von Good, Kramer und Somogyi ausgeführt. Nach vollkommener Lösung des Zwerchfellmuskels in der heißen Kalilauge wurde zur Fällung des Glykogens das Zentrifugierröhrchen mit 3 cm³ 96%igem Alkohol versetzt und nach 24 Std 5 min stark zentrifugiert, wobei das Glykogen sich als Bodenbelag absetzte. Nach Reinigen des Glykogens durch Abgießen der darüberstehenden Flüssigkeit und zweimaligem Waschen mit 60%igem und 96%igem Alkohol und endlichem Trocknen mit ein wenig Äther erfolgte die Hydrolyse des Glykogens durch 20minutiges Einstellen des Zentrifugierröhrchens in ein kochendes Wasserbad nach Zugabe von 2 cm³ 5 n Schwefelsäure (nach Sayun). In je 5 cm³ des auf 50 cm³ gebrachten mit Natronlauge neutralisierten Hydrolysats wurde der Zuckergehalt nach Hagedorn-Jensen bestimmt.

Ergebnisse.

1. Es zeigt sich, daß die Glykogensynthese fördernde Wirkung des Insulins auch bei p_H 7,1 sich geltend macht, bei p_H 6,4 jedoch wesentlich stärker ist (Tab. 1 und 2).

Tabelle 1. *Vergleich zwischen Glukose mit und ohne Insulin bei p_H 7,1.* Glykogenwerte hier und später in Prozent.

Versuch Nr.	Ringer-Glukose 0,5%	Ringer-Glukose 0,5% Insulin 3 E	Differenz
23	0,92	1,31	+0,39
24	0,50	0,71	+0,21
33	1,40	1,55	+0,17
34	0,83	1,27	+0,44
Mittelwert	0,91	1,21	+0,30 = +33%

Die zahlreichen früheren Versuche von Riesser und Mitarbeitern, die stets bei p_H 5,2 durchgeführt wurden, ergaben eine Glykogensynthese-fördernde Wirkung des Insulins von 53 und 61%. *Das Optimum der Insulinwirksamkeit in bezug auf Glykogenaufbau scheint also bei dem sauren p_H-Wert zu liegen.*

Tabelle 2. *Vergleich von Glukose mit und ohne Insulin bei p_H 6,2.*

Versuch Nr.	Ringer-Glukose 5%	Ringer-Glukose 5% Insulin 3 E	Differenz
20	0,74	1,25	+0,51
19	0,71	1,10	+0,39
23	0,51	0,92	+0,41
Mittelwert	0,65	1,09	+0,44 = +68%

2. Riesser sowie Riesser und Mitarbeiter fanden bei p_H 5,2 eine Hemmung der Glykogensynthese aus Glukose, die 35% bzw. 31% betrug. Unsere eigenen Versuche ergeben für p_H 4,9 ein Minus von 20% für p_H 6,2: — 39% und für p_H 7,1: — 23% (Tab. 3, 4 und 5). Die stärkste Wirkung liegt also zwischen p_H 5 und 6. Es ist aber bemerkenswert, daß selbst bei einer der Oxydation des Adrenalins so günstigen Reaktion wie 7,1 die hemmende Wirkung noch relativ stark ist. Auch Tuerkischer und Wertheimer fanden, daß Adrenalin bei p_H 7,4 das Glykogen vermindert.

Tabelle 3. *Vergleich zwischen Glukose mit und ohne Adrenalin bei p_H 4,9.*

Versuch Nr	Ringer-Glukose 0,5%	Ringer-Glukose 0,5% Adrenalin 100 γ	Differenz
7	0,64	0,48	—0,16
9	0,97	0,80	—0,17
Mittelwert	0,80	0,64	—0,16 = —20%

Tabelle 4. *Vergleich zwischen Glukose mit und ohne Adrenalin bei p_H 6,2.*

Versuch Nr.	Ringer-Glukose 0,5%	Ringer-Glukose 0,5% Adrenalin 100 γ	Differenz
41	2,20	1,33	—0,87
42	1,63	1,10	—0,53
15	0,52	0,28	—0,24
13	0,75	0,39	—0,36
Mittelwert	1,27	0,77	—0,50 = —39%

Riesser fand bei p_H 5,2 eine Glykogensynthesehemmung des Adrenalins von —35% und —31%.

3. Der Antagonismus Insulin/Adrenalin, den Riesser bei p_H 5,2 am Ausbleiben sowohl der Insulin- als der Adrenalinwirkung nachwies, blieb in unseren Versuchen vom p_H innerhalb der untersuchten Grenzen unbeeinflußt (Tab. 6 und 7). Die Differenzen zwischen Insulin allein und Insulin + Adrenalin hielt sich in allen Versuchen zwischen 33 und 40%.

Tabelle 5. *Vergleich zwischen Glukose mit und ohne Adrenalin bei p_H 7,1.*

Versuch Nr.	Ringer-Glukose 0,5%	Ringer-Glukose 0,5% Adrenalin 100 γ	Differenz
2	0,33	0,19	—0,14
3	0,45	0,22	—0,23
31	1,40	1,23	—0,17
5	1,01	0,76	—0,25
35	1,00	0,81	—0,19
32	1,77	1,48	—0,29
36	0,48	0,16	—0,32
7	0,64	0,48	—0,16
Mittelwert	0,88	0,69	—0,19 = —23%

Tabelle 6. *Vergleich von Glukose-Insulin mit und ohne Adrenalin bei p_H 6,2.*

Versuch Nr.	Ringer-Glukose 0,5% Insulin 3 E	Ringer-Glukose 0,5% Insulin 3 E Adrenalin 100 γ	Differenz
27	0,81	0,77	—0,04
28	1,02	0,52	—0,50
29	0,85	0,56	—0,29
40	0,96	0,57	—0,39
Mittelwert	0,91	0,60	—0,31 = —34%

Bei p_H 5,2 fanden Riesser —40%, Riesser, Weeke und Ther —38% Insulin-hemmende Wirkung des Adrenalins.

Tabelle 7. *Vergleich zwischen Glukose-Insulin mit und ohne Adrenalin bei p_H 7,1.*

Versuch Nr.	Ringer-Glukose 0,5% Insulin 3 E	Ringer-Glukose 0,5% Insulin 3 E Adrenalin 100 γ	Differenz
25	0,74	0,61	—0,13
26	0,69	0,52	—0,17
27	0,77	0,47	—0,30
38	0,61	0,28	—0,33
Mittelwert	0,70	0,47	—0,23 = —33%

4. *Adrenochrom*, das als Oxydationsprodukt des Adrenalins unter unseren Versuchsbedingungen eine Rolle spielen könnte, war in den Versuchen von Riesser und Mitarbeitern bei p_H 5,2 ohne jede Wirkung im Glukose-haltigen System, im Gegensatz zum Adrenalin. Wir finden es auch, wie Tab. 8 zeigt bei p_H 7,1 ebenso unwirksam.

Die hemmende Wirkung des Adrenalins auf die Glykogenbildung aus Glukose kann also nicht über Adrenochrom gehen, sondern mag vielleicht auf der Bildung eines Zwischenproduktes beruhen.

Tabelle 8. *Vergleich von Glukose mit und ohne Adrenochrom bei p_H 7,1.*

Versuch Nr.	Ringer-Glukose 0,5%	Ringer-Glukose 0,5% Adrenochrom 100 γ	Differenz
44	0,17	0,18	+0,01
43	0,36	0,36	+0,00
51	0,31	0,29	—0,02
55	0,27	0,27	0,0
Mittelwert	0,28	0,28	0,0%

5. Bei p_H 5,2 fanden Riesser und Mitarbeiter eine ebenso weitgehende Hemmung des Insulins durch Adrenochrom wie durch Adrenalin. Wie Tab. 9 zeigt, können wir dies auch bei der ausgesprochen sauren Reaktion von p_H 4,2 bestätigen. Mit 47% übersteigt sie noch die von jenen Autoren gefundene 30%ige Hemmung. Um so bemerkenswerter ist es, daß bei p_H 7,1 Adrenochrom gegenüber Insulin völlig wirkungslos ist (Tab. 10).

Tabelle 9. *Vergleich von Glukose-Insulin mit und ohne Adrenochrom bei p_H 4.2.*

Versuch Nr.	Ringer-Glukose 0,5% Insulin 3 E	Ringer-Glukose 0,5% Insulin 3 E Adrenochrom 100 γ	Differenz
52	1,12	0,53	—0,59
53	1,00	0,55	—0,45
54	1,43	0,70	—0,73
49	0,55	0,42	—0,13
50	0,37	0,17	—0,20
Mittelwert	0,89	0,47	—0,42 = —47%

Tabelle 10. *Vergleich von Glukose-Insulin mit und ohne Adrenochrom bei p_H 7,1.*

Versuch Nr.	Ringer-Glukose 0,5% Insulin 3 E	Ringer-Glukose 0,5% Insulin 3 E Adrenochrom 100 γ	Differenz
45	0,95	0,93	—0,02
46	0,77	0,75	—0,02
55	0,49	0,71	+0,31
47	1,47	1,45	—0,02
48	0,96	0,92	—0,04
Mittelwert	0,93	0,95	±0,0%

Die dem Antagonismus Insulin/Adrenochrom bei saurer Reaktion vielleicht zugrunde liegende Verbindung beider Substanzen oder ihre Reaktion miteinander verläuft also nur im sauren Bereich. An diese Beobachtung wird man denken müssen, wenn man die zwischen Adrenalin und Adrenochrom einerseits, Insulin andererseits sich abspielenden Vorgänge zu erklären sucht, was heute noch kaum möglich erscheint.

Zusammenfassung.

1. Der Einfluß der (H)-Konzentration im Bereich von p_H 4,9, 6,2 und 7,1 auf die Wirkung von Insulin, Adrenalin, Adrenochrom und den Antagonismus von Insulin-Adrenalin sowie Insulin-Adrenochrom auf die Glykogensynthese im isolierten überlebenden Rattenzwerchfell in vitro wurde untersucht.

2. Die Insulin-Wirkung war bei p_H 6,2 stärker als bei p_H 7,1.

3. Das Optimum der Glykogensynthese-hemmenden Adrenalinwirkung lag bei p_H 6,2; bei p_H 7,1 und 4,9 war sie merklich schwächer.

4. Der gegenseitige Antagonismus von Insulin-Adrenalin auf die Glykogensynthese ließ sich durch Änderung des p_H-Wertes nicht beeinflussen.

5. Adrenochrom erwies sich als wirkungslos auf die Glykogensynthese aus Glukose allein; die in diesem System gefundene hemmende Wirkung des Adrenalins kann also nicht über Adrenochrom gehen.

6. Die Insulin-hemmende Wirkung des Adrenochroms erfolgte nur in saurem p_H; sie fehlte bei p_H 7,1, bei welcher Reaktion Adrenalin voll wirksam ist.

Literatur.

Colowick, S. P., C. F. Cori, and M. W. Slein: J. of biol. Chem. **168**, 583 (1947). — Cori, C. F.: Harvey Lect. **41**, 253 (1946). — Gemmill, Ch. L.: Bull. Hopkins Hosp. **66**, 232 (1940); **68**, 329 (1941). — Gemmill, Ch. L., and L. Haman: Bull. Hopkins Hosp. **68**, 50 (1941). — Hastings, A. B., and J. M. Buchanan: Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. **29**, 478 (1942). — Hechter, O., R. Levine, and J. Soskin: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **46**, 390 (1941). — Krahl, M. C., and C. F. Cori: J. of biol. Chem. **170**, 607 (1947). — Marquardt, E.: Z. exper. Med. **112**, 306 (1943). — Ostern, P., J. Herbert, and E. G. Holmes: Biochemic. J. **33**, 1858 (1939). — Riesser, O.: Biochim. et Biophys. Acta **3**, 208 (1941). — Riesser, O., H. Weeke, u. L. Ther: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 12 (1949). — Stadie, W. C., and J. A. Zapp: J. of biol. Chem. **170**, 55 (1947). — Tuerkischer, E., and E. Wertheimer: Biochemic. J. **42**, 603 (1948). — Verzár, F., et V. Wenner: Bull. Soc. Chim. biol. Paris **29**, 304 (1947). — Biochemic. J. **42**, 35 (1948).

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 444—450 (1950).

Aus der Abteilung für experimentelle Therapie an der Medizinischen Fakultät der Universität Freiburg/Brg. (Leiter: Doz. Dr. P. Marquardt).

Zur blutdrucksenkenden Wirkung tyrosinasehaltiger Aufarbeitungen*.

Von

Gerhard Hildebrand und Peter Marquardt.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. Dezember 1949.)

Heirman und Bacq[1] beschrieben vor längerer Zeit eine depressorische Wirkung des mit „Tyrosinase" behandelten Adrenalins, das sogenannte „Adrenoxin". Heirman verwendete als Tyrosinase entweder einfach zerriebene und filtrierte Pilzextrakte (Psalliota campestris) oder in gleicher Weise hergestellte Kartoffelpreßsäfte. Andere Aufarbeitungen der Pilze und Kartoffeln auf Tyrosinase, die Heirman[1] noch vornahm, interessieren im Rahmen unserer Arbeit nicht. Wie die Autoren selbst angeben, ist das Adrenoxin[2] ein „molécule de composition inconnue, qui se forme irrégulèrement dans des circonstances malheureusement mal définies". Es ist also schwer reproduzierbar (Bacq[3]). Da Tyrosinase bereits auf Grund dieser Befunde in der Therapie des Hochdrucks verwendet wird (z. B. Schroeder[4]), hielten wir es für angebracht, die Versuche von Heirman und Bacq zu wiederholen. Wir beschränkten uns für die „Tyrosinasebereitung" auf Kartoffelpreßsäfte (KPS). Das Auftreten einer depressiven Wirkung konnten wir früher bei Verwendung von Pilzextrakten nicht sehen.[5]

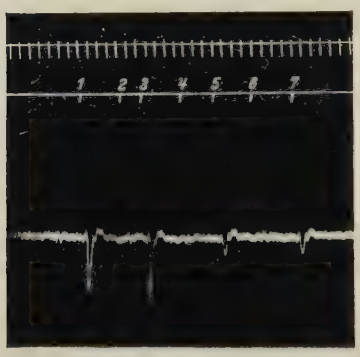


Abb. 1. *Katze*, männlich 2,3 kg, Pernocton 10% 2 ml i.v. 2 cm³ Xylanester Boehringer, Zeitschreibung: 30 sec. 1. 0,5 ml einer Lösung: 10 ml Arterenol Konz. 10^{-5} + 5 Tropfen frischer KPS. Die Lösung stand bis zum Versuch 24 Std; 2. 0,5 ml Ringer-Lösung; 3. 0,5 ml einer Lösung: 10 ml Aqua dest. + 5 Tropfen des gleichen KPS wie in 1.; 4. 0,5 ml Ringer-Lösung; 5. 0,5 wie in 1. aber mit Preßsaft aus einer anderen Kartoffel; 6. 0,5 ml Ringer-Lösung; 7. wie 3. mit Preßsaft aus 5.

Experimentelle Ergebnisse.

Zunächst reproduzierten wir die ursprünglichen Versuche von Heirman und Bacq sowohl mit l-Adrenalin als auch mit l-Arterenol.**

* Herrn Geheimrat Prof. Dr. E. Rost zum 80. Geburtstag.

** Herrn Dr. Tainter New York haben wir für die Überlassung des Arterenols zu danken.

Adrenalinhydrochlorid wurde in der Konzentration 10^{-5} unter Zusatz von 2—16 Tropfen (KPS) auf 10 ml der Adrenalinlösung angesetzt und laufend am Blutdruck und im HAVEMANN-Kolorimeter kontrolliert. p_H der Lösung um 6.

Wir erhielten nach 50 min sowohl mit Adrenalin wie mit Arterenol die ersten Blutdrucksenkungen (Versuchstier: Katze). Die Farbe der Adrenalinlösungen war zu dieser Zeit über rot in gelb übergegangen. Setzten wir nun zur Kontrolle auf die oben beschriebene Weise statt Adrenalin bzw. Arterenol Aqua dest. mit KPS an, so erhielten wir unter gleichen Versuchsbedingungen ebenfalls eine Blutdrucksenkung, welche in Stärke und Ablaufsform der obigen glich. Abb. 1 zeigt diesen Versuch mit zwei verschiedenen Preßsäften am Beispiel des Arterenols. Die Unterschiede im Ausschlag werden später erläutert.

Abb. 2. *Katze*, weiblich, 1,7 kg, Pernocton 10%, 1,2 ml i.v. 2 cm³ Xylanester BOEHRINGER, Zeitschreibung: 30 sec. 2. 0,1 ml KPS frisch; 3. 0,5 ml RINGER-Lösung; 4. 0,1 ml KCl-Lösung 0,155 molar; 5. 0,25 ml der Lösung wie in 4.; 6. 0,5 ml der Lösung wie in 4.; 7. 1,0 ml der Lösung wie in 4.

Die in diesen Vorversuchen beobachteten Blutdrucksenkungen sind also nicht auf Adrenalinabbauprodukte zurückzuführen. Dies veranlaßte uns, die blutdrucksenkenden Eigenschaften von KPS einer näheren Analyse zu unterziehen.

Der filtrierte, unverdünnte Preßsaft führt bekanntlich (HOLTZ und JANISCH[6]) intravenös an der Katze zu einer starken Blutdrucksenkung (Abb. 2), die in ihrem Ablauf einer Azetylcholinwirkung ähnelt. Wird der Preßsaft einige Tage — mindestens 3 Tage — gegen fließendes Leitungswasser dialysiert, so nimmt seine blutdrucksenkende Wirkung sehr stark ab, bzw. verschwindet ganz. Es ist bemerkenswert, daß bei längerem Stehen wieder blutdrucksenkende Wirkungen in einem so dialysierten Preßsaft erscheinen. Enteiweißen mit Alkohol und Aufkochen des Preßsaftes beeinträchtigen die Wirksamkeit nicht wesentlich. Der Effekt des KPS tritt sofort nach dem Zerreiben auf. Ob die Kartoffeln mit oder ohne Schale zerrieben werden, spielt keine Rolle. Fäulnis verstärkt weder noch schwächt sie ab. Aus uns noch nicht bekannten Gründen können nicht aus allen Kartoffeln blutdrucksenkende Preßsäfte gewonnen werden. Der Faktor ist, wie HOLTZ und JANISCH bereits beschrieben, also unregelmäßig und in wechselnder Menge in der Kartoffel enthalten (siehe Abb. 1, zwei verschiedene Preßsäfte geben verschieden starke Senkungen). Er kann, wie wir fanden, fehlen und tritt dann auch

nicht nach längerem Stehen nachträglich auf. Die Alterung der Kartoffeln, frische oder gelagerte am Ende des Winters ergaben keine Unterschiede. Der blutdrucksenkende Effekt des KPS verschwindet zu seinem größten Teil nach Atropinisierung des Tieres (Abb. 3). Nach Holtz und Janisch und nach Bacq und Mitarbeiter[7, 8] sind ja Cholinester reichlich in der Kartoffel enthalten, ohne daß die chemische Natur dieser Ester genau bekannt geworden wäre. Aber wir sehen (Abb. 3) beim atropinisierten Tier nach Gabe von höheren Dosen KPS eine „Restsenkung", welche mit Azetylcholin bei steigender Dosis nicht auftritt. Wir widmeten diesem „Resteffekt" darum besondere Aufmerksamkeit, weil wir selbst durch sein Auftreten in Preßsäften, die keine atropinisierbaren Wirkstoffe

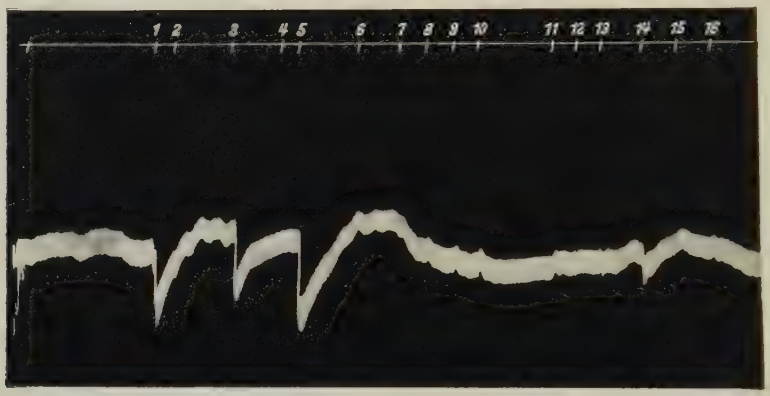


Abb. 3. *Katze*, männlich, 1,2 kg, Pernocton 10%, 0,9 ml i.v. 2 cm³ Xylanester Boehringer, Zeitschreibung: 30 sec. 1. 0,2 ml KPS frisch; 2. 0,3 ml Ringer-Lösung; 3. 0,1 ml KPS frisch; 4. 0,3 ml Ringer-Lösung; 5. 0,2 ml Azetylcholin 10^{-7}; 6. 0,3 ml Ringer-Lösung; 7. 0,2 ml Atropinlösung 10^{-2}; 8. 0,2 ml Atropinlösung 10^{-2} 9. 0,2 ml Atropinlösung 10^{-2}; 10. 0,4 ml wie 7.—9.; 11. wie 5.; 12. 0,3 ml Ringer-Lösung; 13. wie 1.; 14. 0,4 ml wie 1.; 15. 0,3 ml Ringer-Lösung; 16. 0,4 ml wie 5.

enthalten, anfänglich zu der Annahme geführt wurden, daß der blutdrucksenkende Effekt nicht atropinisierbar sei. Vorbehandlung mit einem Antihistaminicum (Antistin) beeinflußte die pressorische Wirkung des KPS nicht. Auch Holtz und Janisch[6] sprachen sich gegen Histamin als depressorischen Wirkstoff in der Kartoffel aus.

Die Kartoffel ist bekanntlich besonders reich an Kaliumsalzen. Diese senken zwar nicht regelmäßig, aber doch meistens den Blutdruck. Deshalb wurden Lösungen bekannten Kaliumchloridgehaltes mit bestimmten Mengen KPS verglichen. Es ergab sich dabei folgendes: Am Blutdruck konnte selbst mit einer Kaliumchloridmenge (0,1—1,0KCl [0,155molar]), welche das Mehrfache der in dem verwendeten KPS vorliegenden betrug, niemals auch nur annähernd gleichartige Blutdrucksenkung erzielt werden (Abb. 2). Wurde eine Menge KPS, die sicher blutdrucksenkend war, (in Platin) verascht und der so gewonnene Rückstand in Ringer-Lösung

in gleicher Konzentration wieder aufgenommen, so war damit keine Blutdrucksenkung mehr zu erzielen. Um die Frage zu entscheiden, ob etwa zur Wirkung des Kaliums im KPS z. B. kolloidale Träger notwendig seien, wurde veraschter KPS mit dialysiertem, also blutdruckunwirksamem KPS versetzt. Diese Aufarbeitung blieb wirkungslos. Der Zusatz von Kaliumchlorid zu dialysiertem (wirkungslosem) KPS ist ebenfalls wirkungslos.

Am Froschherz nach STRAUB läßt sich zeigen, daß zwischen frischem und veraschtem KPS ein Wirkungsunterschied von zirka 90% besteht. Der diastolische Herzstillstand durch veraschten KPS war durch Zusatz von Kalziumchlorid zu beheben (z. B. Abb. 4).

Bemerkt werden soll noch, daß veraschter Preßsaft bei Aufnehmen mit destilliertem Wasser alkalisch reagiert (p_H 9). In den Versuchen, die in Abb. 4 abgebildet sind, wurde der Rückstand mit HCl neutral gestellt.

Nach unseren Versuchen beruht also die depressorische Wirkung des KPS zu zirka 10% auf seinem Kaliumgehalt. 90% ist atropinisierbar. Damit ist die Frage noch nicht geklärt, ob die Tyrosinase selbst, deren genaue chemische Struktur noch unbekannt ist, eine blutdrucksenkende Wirkung auslöst.

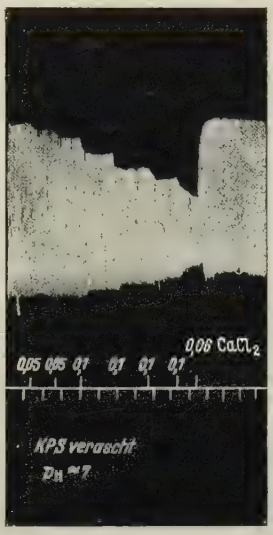


Abb. 4. *Frosch*, isoliertes Herz nach STRAUB. Der Abfall im Anfangsteil der Abbildung wurde in Stufen durch 0,05; 0,05; 0,1; 0,1; 0,1; und 0,1 ml Lösung der Asche von KPS ($p_H \sim 7$), aufgenommen in Frosch-RINGER-Lösung, bewirkt. Der Wiederanstieg erfolgt auf Gabe von 0,06 ml Kalziumchloridlösung 0,11 molar.

Nach WARBURG und KUBOWITZ[9, 10, 11] handelt es sich bei der Tyrosinase um ein Kupferproteid, das durch Dialyse weitgehend gereinigt werden kann. Durch Dialyse gegen $^1/_{100}$n NaCN kann das Kupfer dem Proteid entzogen werden. Das Ferment ist dann ohne Einfluß auf Tyrosin. Setzt man der so entkupferten Fermentlösung Kupferionen zu, so tritt ihre Wirkung wieder auf. Dieser Versuch schien uns geeignet festzustellen, ob dieses Kupferprotein auch etwas mit der blutdrucksenkenden Wirkung des KPS zu tun hat.

KPS wurde 6 Std gegen n/100 NaCN, anschließend 24 Std gegen Aqua dest. dialysiert. Das Wasser wurde alle 2 Std gewechselt. Ein Teil des so behandelten KPS wurde kurz vor der Injektion mit $CuSO_4$ regeneriert (2 mg $CuSO_4$ auf 10 ml KPS).

Es zeigte sich, daß die kupferfreie und die regenerierte Lösung beide keine Blutdrucksenkung hervorriefen. Wir schließen daraus, was man auf Grund des Wirkungsverlustes in der gewöhnlichen Dialyse bereits annehmen mußte, daß ein Kupferproteid nichts mit der Blutdrucksenkung zu tun hat.

Wenn man nun einmal von der Wirkung auf den Blutdruck absieht, und die Eigenschaft „tyrosinasehaltiger" Aufarbeitungen auf die Adrenalinverfärbung am Beispiel des KPS betrachtet, so ergibt sich: Nativer KPS, dialysierter (blutdruckinaktiver) KPS, gegen NaCN dialysierter KPS (also mit entkupferter Tyrosinase) und gegen NaCN dialysierter mit Cu* regenerierter KPS verfärben Adrenalinlösungen (10^{-5}) für das Auge ohne nennenswerte Unterschiede. Diese Frage soll gesondert behandelt werden.

Diskussion.

An einem Versuchsmaterial von 21 Tieren in 78 KPS Ansätzen konnte ein „Adrenoxin" mit KPS nicht nachgewiesen werden. Es steht dies in Übereinstimmung mit den Entdeckern, die das Adrenoxin als „mal definie" bezeichnen[14]. Es muß mit Nachdruck darauf hingewiesen werden, daß experimentelle Untersuchungen auf diesem Gebiet auf große Schwierigkeiten stoßen. Da kleine Adrenalindosen, wie bekannt, oft den Blutdruck senken, kann bei Oxydation des Adrenalins oder des Arteronols in der Lösung dieser Dosenbereich erreicht werden, und „Adrenoxin" vortäuschen.

Weiter können in den zugesetzten Fermentlösungen vasodepressorische Stoffe enthalten sein, deren Aktion zunächst durch die starke Adrenalinwirkung überdeckt ist, aber nach deren Verschwinden zutage tritt. Weiterhin besteht Anlaß, auf die bekannte Blutdruckwirksamkeit von Säuren und Laugen bei dieser Gelegenheit hinzuweisen. Die Wahl der Neutralisationsmittel ist bekanntlich von pharmakologischer Bedeutung. Es sei dies an einem einfachen Beispiel demonstriert. Bernsteinsäure, die im Zusammenhang mit Adrenalin viel bearbeitet wurde (Marquardt[15, 16, 17], von der Wense[18]) wirkt intravenös gegeben blutdrucksteigernd (Marquardt[19]), Ammoniumhydroxyd dagegen (intravenös) senkend. Wird Bernsteinsäure mit Ammoniumhydroxyd neutralisiert, so setzt sich die senkende Wirkung des Ammoniaks durch (Abb. 5 u. 5a), welche, falls Adrenalin beigegeben war, nach dessen Oxydation irrtümlich als „Adrenoxin" gedeutet werden könnte.

Weiter kann Adrenoxin dadurch vorgetäuscht werden, daß selbst in einem unwirksamen dialysierten Preßsaft sich der depressorische Wirkstoff, wie erwähnt, nachbildet.

Unsere vorliegenden Versuche schließen nicht aus, daß mit anderen Oxydationsverfahren aus dem Adrenalin blutdrucksenkende Stoffe gewonnen werden können. So fand 1897 Gürber[20] vor Isolierung des Adrenalins, daß im Bombenrohr erhitzte Nebennierenextrakte blutdrucksenkend wirken. Marquardt[21] wiederholte Gürbers Versuche mit Adrenalin und konnte diese Wirkung auf erhitztes bzw. zerstörtes Adrenalin

* Daß Kupferionen den Adrenalinabbau beschleunigen, soll natürlich nicht bestritten werden (Übersicht bei Lavollay[12]). Siehe auch den Einfluß des Kupfers auf die Pigmentbildung (Cohen[13]).

beziehen. Verda, Kneer und Burge[22] erhielten Blutdrucksenkungen durch U. V. bestrahltes Adrenalin. Diese Wirkungen wurden von uns früher auf Phenole und Indole zurückgeführt. Nun könnte man, wie wir es früher getan haben, auch die Wirkungen des durch KPS oxydierten Adrenalins auf entstandene Phenole oder Indole beziehen. Dem muß man entgegenhalten, daß in größeren Versuchsreihen, um solche Wirkungen

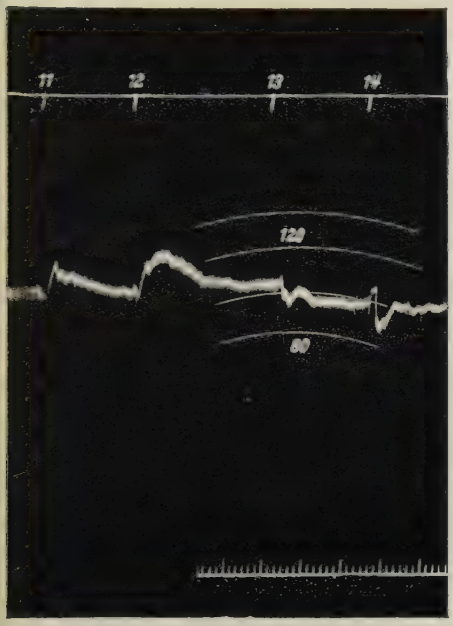


Abb. 5.

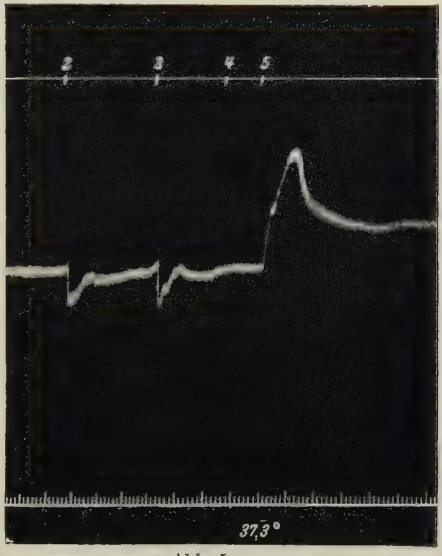


Abb. 5a.

Abb. 5. *Katze*, weiblich, 1,9 kg, Evipan 10%, 0,9 ml i.v. und 2,5 ml i.m., 2 cm³ Xylanester Behnend (Thrombozid), Zeitschreibung: 1 min unterteilt in 10 sec. 11. 0,6 ml 4% Bernsteinsäurelösung; 12. 1,2 ml wie in 11.; 13. 0,5 ml NH_4 OH (1 n); 14. 1,0 wie in 13.

Abb. 5a. Gleiches Tier in gleicher Anordnung. 2. 0,5 ml 5% Bernsteinsäurelösung mit NH_4 OH auf ~ p_H 7 gestellt; 3. 1,0 ml der Lösung wie 2.; 4. 0,5 ml Ringer-Lösung; 5. 10 γ Adrenalin.

mit diesen Stoffen an unserem heutigen Tiermaterial zu erzielen, höhere Dosen notwendig sind, als sie aus einer Adrenalinkonzentration von 10^{-5} entstehen könnten. Blutdrucksenkende Wirkungen, die in diesen Versuchen zu beobachten waren, konnten sämtlich auf die depressorischen Eigenschaften des KPS zurückgeführt werden. Die depressorische Wirkung des KPS, welcher einen beschleunigten Adrenalinabbau und damit ein beschleunigtes Verschwinden der Adrenalinkreislaufwirkung bewirkt, kann in Mischung mit Adrenalin nur beobachtet werden, wenn durch Oxydation das Adrenalin zerstört ist.

Daß nicht nur Derivate des Dihydroindols (Adrenochrom), sondern auch Indolkörper beim Abbau von Adrenalin auftreten, ist nach den Arbeiten von Mason[24] sehr wahrscheinlich. An seinem Tiermaterial im

letzten Kriegsjahr (also unter Mangelernährung) hat der eine von uns (Marquardt[23]) eine Ansprechbarkeit auf zirka 10 Gamma Indol regelmäßig gesehen und schloß daraus, daß es sich bei den Versuchen von Heirman und Bacq um Wirkungen von Phenolen oder Indolen handeln müsse, die beim Adrenalinabbau entstehen können. Das heutige Tiermaterial spricht jedoch auf derartige niedrige Dosen nur sehr selten an. Überhaupt ist die Ansprechbarkeit der Tiere auf Substanzen dieser Stoffklasse äußerst wechselnd (Marquardt[25]).

Weiter zeigen die Versuche, daß blutdrucksenkende Wirkungen von tyrosinasehaltigen Aufarbeitungen (KPS) nicht auf das Kupferproteid zurückgeführt werden konnten. Damit ist der therapeutische Wert von „Tyrosinase" bei Hochdruck fraglich geworden.

Zusammenfassung.

Blutdrucksenkende Wirkungen von KPS mit und ohne Adrenalin- oder Arterenolzusatz wurden im Hinblick auf „Adrenoxin" untersucht. Hierbei wurde auch der KPS mit Berücksichtigung einer eventuellen Wirksamkeit des Kupferproteids Tyrosinase aufgearbeitet und geprüft.

Literatur.

[1] Heirman, P. présenté par Z. M. Bacq: Extr. d. C. v. d. Séances d. l. Soc. Biol. (Belge) T. CXXIV, 1250 (1937). — [2] Marquardt, P.: Pharmazie **4**, 7 (1949) (Literaturübersicht). — [3] Bacq, Z. M.: Presse Médicale **1947**, 175. — [4] Schroeder: Praxis, Schweiz. Rundschau f. Med. **1941**, 847. — [5] Marquardt, P., R. Koch u. Aubert, P.: Enzymologia XII, 188 (1947). — [6] Holtz, P., u. Janisch: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (D) **187**, 336 (1937). — [7] Bacq, Z. M., u. Oury, A.: Arch. int. Physiol. **47**, 92 (1938). — [8] Bacq, Z. M.: Bull. Acad. Roy. Méd. Belg. CL. Sc. **24**, 545 (1938). — [9] Kubowitz: Biochem. Z. **292**, 221 (1937). — [10] Kubowitz: Biochem. Z. **299**, 22 (1938). — [11] Warburg, O.: Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten, Berlin: Verlag Saenger, 1948. — [12] Lavollay, J.: L'autoxydation des diphénols en particulier de l'adrenaline, Paris: Verlag Herrmann 1943. — [13] Cohen, G. N.: C. r. d. Soc. Chim. Biol. **23**, 1504 (1941). — [14] Bacq, Z. M.: Journ. Med. Belg. Neerland, Luxemb. et Suisses Bâle le 5. X. 1947. — [15] Marquardt, P.: Klin. Wschr. **18**, 252 (1939). — [16] Marquardt, P.: Enzymologia **6**, 329 (1939). — [17] Marquardt, P.: Z. f. ges. exp. Med. **109**, 354 (1941). — [18] v. d. Wense: Z. f. physiol. Chem. **260**, 100 (1939). — [19] Marquardt, P.: Z. f. ges. exp. Med. **108**, 788 (1941). — [20] Gürber: Physikalisch-medizinische Gesellschaft Würzburg, Sitzung vom 16. 6. 1897. — [21] Marquardt, P.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (D) **199**, 554 (1942). — [22] Verda, Kneer u. Burge: J. Pharmakol. (Am) **42**, 383 (1931). — [23] Marquardt, P.: Rev. Scientifique **85**, 736 (1947). — [24] Mason, J. H.: Experientia IV, **18**, 307 (1948). — [25] Marquardt P.: Z. f. ges. innere Med. und ihre Grenzgebiete **3**, 316 (1948).

Dozent Dr. P. Marquardt, Freiburg i. Br.
Abt. f. Exper. Therapie d. Med. Fakultät, Hugstetterstr. 55.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 451—457 (1950).

Aus der Mediz. Fakultät der Universität Skopje / N. R. Makedonija Jugoslavija.

Über Histaminwirkungen am Modell der Selyeschen Formalin-Arthritis.

Von

Horst Uebel und Günter Korting.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 18. Januar 1950.)

In der medizinischen Grundlagenforschung unserer Zeit, die in steigendem Maße um eine Einordnung ihrer bisherigen Ergebnisse nach zentralen Gesichtspunkten bemüht ist, findet gegenwärtig, etwa neben der Lehre von der serösen Entzündung oder den Neurodystrophie-Anschauungen Speranskys, nun auch die Adaptations-Syndromatik von H. Selye zunehmende Beachtung*. Das Wirkungsprinzip des „general adaptation syndrome", das sich nach Selye vornehmlich aus Leistungen der Hypophyse, mehr noch aber der Nebennierenrinde zusammensetzen soll, wird durch Reaktionsauslösung nach Belastung („stress") direkt oder durch Unterdrückung der dem Syndrom zugeordneten Effekte nach Ausschaltung der betreffenden endokrinen Organe indirekt gefolgert.

Es ist eigentlich selbstverständlich, daß eine weitherzige Anwendung der Selyeschen Betrachtungsweise auf die verschiedensten patho-physiologischen Abläufe fast notwendigerweise zur Auseinandersetzung mit den üblichen, mehr peripherisch orientierten Anschauungen führen muß. Das erscheint uns vor allem erforderlich bei den letzten Ausführungen Selyes über die experimentelle Formalin-Arthritis (F.-A.), deren Steuerung, bzw. Hemmung, von ihm lediglich im Sinne seiner Adaptationslehre gesehen werden.

Im einzelnen diskutiert Selye dabei folgende kausalgenetische Zusammenhänge: Die Abschwächung oder auch Verhinderung der F.-A. durch A.C.T.H., Cortisone und die Alarmreaktion sei die Folge eines direkt am geschädigten Gewebe (Gelenk, Verff.) wirksam werdenden, durch Cortisone-ähnliche Glukocorticoide bedingten Effektes, der möglicherweise mit der Anti-Hyaluronidase- oder Anti-Histamin-Wirkung der Glukocorticoide erklärt werden könnte. Dieser Effekt sei ferner auch für die Erscheinung der „gekreuzten Resistenz" verantwortlich zu machen, und zwar einerseits deswegen, weil diese „gekreuzte Resistenz" nur dann

* Eine neuere deutschsprachige Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Selyeschen Schule stammt von H. Kutschera-Aichbergen (Ars Medici 1949, Nr. 2, S. 107).

zur Beachtung komme, wenn der Organismus Gelegenheit habe, während einer Alarmreaktion vermehrt Corticoide zu bilden, und andererseits, weil die klinischen Phänomene einer nur schwach ausgebildeten „gekreuzten Resistenz" durch Antihistaminika abgeschwächt werden können. Dies würde bedeuten, daß eine Abschwächung der F.-A. nach Vorbehandlung mit A.C.T.H., Cortisone oder durch die Alarmreaktion über eine endokrin gesteuerte Mehrproduktion cortisone-ähnlicher Glukocorticoide zustande käme.

Wenn auch diese Gedankengänge Selyes nicht unbedingt als weit hergeholt („far-fetched") anzusprechen sind, so schien uns immerhin doch die von Selye völlig übergangene pathophysiologische Möglichkeit untersuchungswert, ob nicht auch in anderer Weise, z. B. durch lokal-peripher begrenzte Maßnahmen oder Vorgänge seine Modellarthritis wesentlich zu beeinflussen ist. Bei der Wichtigkeit dieser Problematik (auch in klinisch-therapeutischer Hinsicht, siehe Selye) haben wir ein paar einfache, leicht reproduzierbare Versuche durchgeführt, mit deren Hilfe wir folgende Fragen einer Klärung näher zu bringen suchten:

1. Läßt sich durch lokale Vorbehandlung mit Histamin eine Abschwächung der F.-A. erzielen und

2. — wenn dies der Fall sein sollte — handelt es sich dann um eine *rein lokale* Wirkung oder kommt dem abgeschwächten Effekt der Zweitschädigung (Formalin) die Bedeutung einer „gekreuzten Resistenz" im Sinne Selyes zu?

Material und Methodik.

Zu den Versuchen wurden ausnahmslos männliche Albinoratten von 130,0 bis 150,0 g Gewicht und annähernd gleicher Größe verwandt, um die durch individuelle Größenunterschiede bedingten Schwierigkeiten bei der Beurteilung pathologischer Veränderungen weitgehendst auszuschalten. Zur Injektion gelangte immer nur eine 1%ige Formalinlösung, bzw. eine Histaminlösung 1:1000 „Imido-Roche". Auf genaue Verabreichung (Tuberkulinspritze!), besonders auch in zeitlicher Hinsicht (die gleichen Lösungen möglichst zur gleichen Zeit!), wurde besondere Sorgfalt verwendet. Die Tiere wurden bei gewöhnlicher Stallkost und Zimmertemperatur (18—20° C) gehalten, um „stress"-Wirkungen auszuschließen. Nur durch diese Maßnahme scheint überhaupt eine relativ fehlerfreie Vergleichsbasis für die zu erwartenden, lediglich makroskopisch zu beurteilenden unterschiedlichen pathologischen Veränderungen hinreichend gesichert.

Versuche und Ergebnisse.

1. Versuchsgruppe: Wirkung von Formalin nach Histaminvorbehandlung an derselben Pfote.

Eingesetzt wurden insgesamt 11 Tiere, unterteilt in 3 Gruppen.

1. 5 Tiere erhalten unter die Plantaraponeurose der re. Hinterpfote je 0,1 cm^3 Histaminlösung. Im Verlauf der nächsten Minuten entwickelt sich eine deutliche Rötung ohne sonderliche Schwellung oder besonderes Verhalten der Tiere. Nach 8 min bekommen alle 5 Ratten in dieselbe Pfote subaponeural 0,1 cm^3 Formalinlösung. 10 min später werden die Tiere unruhig und halten durchweg die behandelte

Pfote zum Teil unter starkem Tremor in Flexionshaltung. Etwa 20 min nach der Formalininjektion zeigt sich starke Rötung, pralle Schwellung, so daß die Falten der Planta verstrichen sind, sowie weiterhin Schonhaltung. — Nach 24 Std ist die re. Hinterpfote eben erkennbar gerötet und etwas ödematös im Vergleich zur linken, jedenfalls aber weit schwächer als am Vortage. — Nach 48 Std weiteres Abklingen der Erscheinungen.

2. Kontrollen: Formalin allein. 3 Tiere bekommen in die re. Hinterpfote *nur einmalig* 0,1 cm³ Formalinlösung. Im Verlauf der nächsten Minuten zeigen die Pfoten langsam zunehmende Rötung und Schwellung, wobei aber nach 20 min immer noch die Plantarfalten enthalten sind. — Nach 24 Std markante Rötung und Ödem, auf jeden Fall weit stärker als am Vortage. — Nach 48 Std Erscheinungen vielleicht eher noch stärker, mindestens aber ebenso stark wie am Vortage.

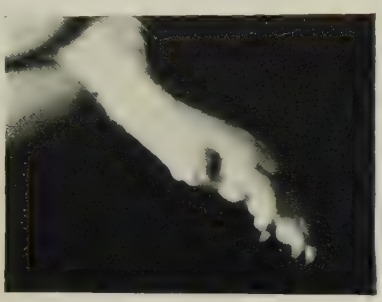


Abb. 1.

Abb. 2.

Abb. 1 u. 2. 2. Versuchsgruppe: 0,1 cm³ Histaminlösung 1:1000 subaponeural in die *li.* Hinterpfote; 8 min später 0,1 cm³ 1%ige Formalinlsg. in die *re.* Hinterpfote. Bild nach 24 Std; starke Rötung und Schwellung der re. Hinterpfote; 1. im Profil; 2. von der Plantarfläche gesehen.

3. Kontrollen: Histamin allein. 3 Tiere bekommen in die re. Hinterpfote nur einmalig 0,1 cm³ Histaminlösung. Schon nach 3 min auffällige Rötung und geringe Schwellung, die beide nach 10 min noch etwas stärker ausgeprägt sind. — Nach 24 Std re. Hinterpfote vielleicht etwas stärker gerötet. — Nach 48 Std re. Hinterpfote gleich linke.

2. *Versuchsgruppe:* Wirkung von Formalin nach Histaminvorbehandlung der anderen Hinterpfote.

Eingesetzt wurden 14 Tiere, unterteilt in 4 Gruppen.

1. 5 Ratten bekommen 0,1 cm³ Histaminlösung, diesmal subaponeural in die *linke* Hinterpfote, worauf sich die oben beschriebenen typischen Histaminwirkungen abspielen. 8 min später werden je 0,1 cm³ Formalinlösung in derselben Weise in die *rechte* Hinterpfote injiziert. An dieser rechten Pfote entwickelt sich allmählich eine zunehmende Rötung und Schwellung, die nach 20 min immer noch die Plantarfalten erkennen läßt. — Nach 24 Std ausgesprochene Rötung und Schwellung mit Verstreichen der Gelenkkonturen, d. h. die Veränderungen sind weit mehr ausgeprägt als am Vortage (Abb. 1 u. 2). — Nach 48 Std sind die Erscheinungen eher noch in verstärkter Intensität ausgebildet, jedenfalls aber nicht schwächer als am Vortage.

2. Kontrollen: Histamin und Formalin an derselben Pfote. Bei 5 Tieren wurden je 0,1 cm³ Histaminlösung unter die Plantaraponeurose der rechten Hinterpfote

injiziert; anschließend entwickeln sich die genannten Erscheinungen. Nach 8 min Injektion von 0,1 cm³ Formalinlösung in *dieselbe* Pfote. Im weiteren Verlauf treten die bei der ersten Versuchsgruppe beschriebenen Veränderungen auf, d. h. nach anfänglich perakuter Reaktion des geschädigten Gewebes mit starker Hyperämie und Ödem bilden sich diese Veränderungen im Verlaufe der nächsten 24 Std allmählich wieder zurück, um nach 48 Std fast kaum noch bemerkbar zu sein (Abb. 3 u. 4).

3. Kontrollen: Formalin allein. 2 Tiere bekommen nur einmal je 0,1 cm³ Formalinlösung in die rechte Hinterpfote. Die Erscheinungen zeigen in der Hauptsache denselben zeitlichen Intensitätsablauf wie die entsprechenden Kontrolltiere der Gruppe 1. Nach 48 Std waren jedenfalls Rötung und Schwellung noch kaum abgeklungen.

4. Kontrollen: Histamin allein. 2 Tiere bekommen nur einmal je 0,1 cm³ Histamin-

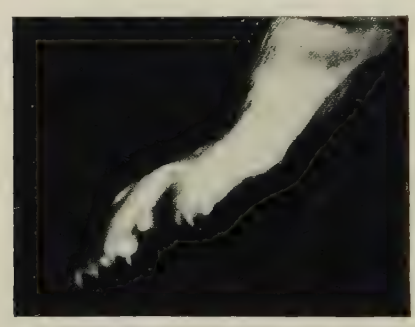


Abb. 3.

Abb. 4.

Abb. 3 u. 4. 2. Versuchsgruppe, *Kontrolle:* Histamin und Formalin in derselben Weise an *derselben* Pfote. Bild nach 24 Std; Rötung und Schwellung viel weniger stark ausgebildet; 3. im Profil; 4. von der Plantarfläche gesehen.

lösung in die linke Hinterpfote. Typische Histaminreaktion, die bereits am nächsten Tag fast abgeklungen ist.

3. Versuchsgruppe: Wirkung von 2, im Abstand von 24 Std vorgenommenen Formalinjektionen nach jeweils vorangehender Histaminbehandlung derselben und der anderen Hinterpfote.

Auch diese Versuchsanordnung ergab bei 6 Tieren gleichgerichtete Ergebnisse wie bei der 1. und 2. Versuchsgruppe.

Besprechung.

Da unsere Versuche sich lediglich mit der experimentellen F.-A. und deren Beeinflussung befassen, erübrigt sich an dieser Stelle ein näheres Eingehen auf die Frage, inwieweit überhaupt Experimental-Modell und entsprechende Human-Erkrankung gleichgesetzt werden können, ebenso wie pathogenetische Bemerkungen zur Bedeutung von zentral-nervöser (STURM) oder hypophysaer-suprarenaler (SELYE) Leitung des rheumatischen Krankheitsgeschehens und deren Abgrenzung zueinander.

Für den Fall der experimentellen F.-A. nun ist jedenfalls aus unseren Versuchen einwandfrei die Aussage abzuleiten, daß Histamin in entscheidender Weise Bild und Verlauf der F.-A. abändert: Über eine vorüber-

gehende Verstärkung des pathologischen Vorgangs, dessen Höhepunkt bereits etwa nach 24 Std überschritten ist, erfolgt makroskopisch ab 2. Beobachtungstag Rückbildung bis schließlich zur Norm, was *ohne* vorangehende lokale Histaminbehandlung in dieser Weise nie gesehen wird.

Zwar ist die Behandlung von Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises (wenn auch mehr der chronischen Erscheinungsbilder) mit Bienengift, das nach Feldberg und Kellaway histaminhaltig ist, ebenso altbekannt, wie ganz allgemein die günstige Beeinflussung hyperergischer Erkrankungen mit wiederholten kleinen Histamingaben (Dzsinich, Gotsch); doch kann natürlich die F.-A. nicht ohne weiteres als Typ einer hyperergischen Krankheitsform gelten. Vielleicht kommt es aber unter der Histaminhyperämie zur rascheren „Verarbeitung" und zu schnellerem Abtransport des Formalins, wenn man nicht auch an direkte „Neutralisierungs"-Vorgänge denken will unter Hinweis auf Kendall, der auf die Hemmung von Histamin durch Formaldehyd aufmerksam gemacht hat. Vor allem kommt aber wohl auch eine starke Anregung der örtlichen Elemente des RES in Betracht, da Histamin nach Janzsó dessen physiologischen Aktivator darstellt. Das scheint uns unbedingt wahrscheinlich, auch wenn Loos gerade der von uns verwendeten Histaminkonzentration von 1:1000 eine besondere Wirkung bezüglich lokaler Phagozytoseförderung abspricht. Welche Teilvorgänge nun aber im einzelnen überwiegen, ist nicht von so entscheidender Wichtigkeit und war auch nicht Ziel unserer Untersuchungen. Von größerer Bedeutung ist dagegen die Beantwortung der Frage, ob nicht durch die vorangegangene Histaminwirkung u. a. eine Stimulation der Nebennierenrinde, letzten Endes also doch eine Reaktion im Sinne Selyes erfolgt sei, die dann die von uns gefundene Verlaufsänderung, d. h. Abschwächung, der F.-A. nach Histamin verursacht hätte. Abgesehen davon, daß wir in der uns zur Verfügung stehenden Literatur keinen Hinweis für eine solche Einflußnahme des Histamins auf die Nebennierenrinde fanden — höchstens daß umgekehrt nach Bomskov und Bakuren Histamineffekte durch Nebennierentätigkeit reguliert werden können („counter-balancing") —, ist doch einer solchen Annahme entgegenzuhalten, daß eine derartige von der Nebennierenrinde gesteuerte Abschwächung der F.-A. dann selbstverständlich auch von jeder beliebigen Körperstelle aus zu erhalten gewesen sein müßte; tatsächlich war sie aber (vgl. 2. Teil unserer Versuche) nur dann zu erzielen, wenn Histamin und Formalin an etwa gleicher Stelle appliziert wurden. Scheint damit die Annahme der in diesem Zusammenhang beobachteten Histaminwirkung als eines nur vorwiegend lokal begrenzten, gegen das Formalin gerichteten, selbständigen Schutzeffektes gesichert, so entfällt damit zugleich der Einwand, es handele sich dabei um die Erscheinung der „gekreuzten Resistenz".

Mit dieser Auffassung unserer Versuchsergebnisse wird keineswegs die von Selye beschriebene Schutzwirkung der Alarmreaktion oder der neuen Substanzen A.C.T.H., bzw. Cortisone, gegenüber der F.-A. in Abrede gestellt, sondern nur ein Hinweis gegeben, daß dem Organismus grundsätzlich, entsprechend dem bekannten Prinzip der „doppelten Sicherung", anscheinend mehrere Aktionsmöglichkeiten zur Abwehr zur Verfügung stehen, darunter eben auch lokal-peripherische Mechanismen (so z. B. Histaminentfesselung), deren Bedeutung, wie aus unseren Versuchen ersichtlich, keineswegs unterschätzt oder vergessen werden sollte. Bemerkenswerterweise stellt schließlich Selye die Alarmreaktion sowie das A.C.T.H., bzw. Cortisone, der Gruppe der modernen *Antihistaminika* nahe, während wir gerade in umgekehrter Weise eine Beeinflussung der F.-A. im Sinne einer Schutzeffektwirkung mit der *polaren Substanz, dem Histamin*, erzielen konnten. Im einzelnen erscheint dabei auffällig, daß Selye, genau wie wir für das Histamin, auch für die von ihm verwendeten Substanzen (also *Anti*histaminika in seinem erweiterten Sinne) zur Erklärung dieses Schutzeffektes gegenüber dem Formalin eine lokal gesteigerte Tätigkeit der Makrophagen in Erwägung zieht. Letzten Endes handelt es sich aber bei solchen Fragenkomplexen immer um Einwirkungen auf die Gefäß-Gewebsschranke (Kapillarpermeabilität), wie das auch in der gegenwärtigen Diskussion über Histamin und Antihistaminika deutlich zum Ausdruck kommt (z. B. Halpern).

Zusammenfassung.

1. An Hand der Beobachtung analoger Schutzeffekte, die, wie bei Gelenkaffektionen des Menschen, auch bei einer mit Formalin erzeugten Modellarthritis der Ratte durch Anwendung von A.C.T.H., bzw. Cortisone, hervorgerufen wurden, deutet Selye den Aktionsmechanismus dieser Substanzen im Sinne seiner Adaptationslehre, wobei er u. a. auch eine, dem Funktionsmodus der modernen Antihistaminika gleichgerichtete Wirkungsweise dieser Stoffe in Betracht zieht.

2. Ohne auf die weitreichende Theorienbildung Selyes näher einzugehen, erscheint es aber bemerkenswert — und das ist der Zweck dieser Mitteilung —, daß ähnliche Abschwächungseffekte am Modell der Formalin-Arthritis, anscheinend auch ohne den Umweg über zentrale Regulationsmechanismen (Hypophyse, Nebennierenrinde), *lokalperipher*, z. B. durch Histaminentfesselung (ev. als Eigenmechanismus des Organismus), bzw. durch Histaminapplikation (im Experiment) zu erhalten sind.

3. Der vorwiegend lokal-periphere Charakter dieses Vorganges ergibt sich aus der Tatsache, daß der Abschirmeffekt des Histamins gegenüber der Formalin-Arthritis der Ratten nur bei Injektionen von Histamin und Formalin an etwa gleichem Ort zu beobachten ist.

Literatur.

Bomskov u. Bakuren, zit. bei Fabinyi u. Szebehelyi: Acta allerg. Vol. II, Fasc. **3**, 242 (1949). — Dzsinich: Klin. Wschr. **1935 II**, 1613. — Feldberg u. Kellaway, zit. bei Dale: Brit. med. J. **1948**, 281. — Gotsch: Z. klin. Med. **129**, 607 (1936). — Halpern: Presse méd. **1949**, Nr. 65. — Janzsó, zit. bei Melczer: Dermatologica, Vol. **97**, 69 (1948). — Kendall, zit. bei Feldberg u. Schilf: Histamin, Springer 1932. — Loos: Z. exp. Med. **75**, 463 (1931). — Selye: Brit. med. J. **1949**, 1129. — Sturm: Schweiz. med. Wschr. **46**, 1099 (1949).

Dr. Horst Uebel, Patološki-anatomski institut, Medicinski fakultet, Skopje N. R. Makedonija, Jugoslavija.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 458—467 (1950).

Aus dem Pathologisch-anatomischen Institut der Medizinischen Fakultät, Skopje/N. R. Makedonija, Jugoslavija.

Über unterschiedliche östrogene und Wachstumswirkungen wäßriger Extrakte aus Frisch- und Filatov-Plazenta.

Von

Horst Uebel

unter Mitwirkung von cand. med. G. Georgievski.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 18. Januar 1950.)

Frühere Untersuchungen über Gefäßwirkungen wäßriger Extrakte aus Frisch- und Filatov-Plazenta ergaben am Krawkow-Präparat bei der nach Anitschkow und Soloweitschik modifizierten Versuchsanordnung einen deutlichen arterienverengernden Effekt, der mit Hilfe der dreifachen Reaktion wohl in der Hauptsache auf die Wirkung von H-Substanzen zurückgeführt werden mußte (Korting und Uebel). Die im Verlauf derartiger Durchströmungsversuche auftretenden feineren Schwankungen der pro Zeiteinheit passierenden Flüssigkeitsmenge ließen von Anfang an daran denken, daß es sich dabei nicht um die gleichgerichtete Wirkung einer einheitlichen Substanz oder Substanzengruppe handeln konnte, sondern daß vielmehr mit dem Vorliegen eines Mischresultates gegeneinander konkurrierender vasodilatatorischer und -konstriktorischer Stoffe gerechnet werden mußte. Lassen wir die gefäßerweiternden Substanzen bisher noch nicht völlig geklärter Konstitution (Padutin, Substanz P, sogenannte vierte hypotensive Substanz) außer Betracht — zumal über ihr Vorkommen in der Plazenta, soweit wir sehen, nichts bekannt ist —, so ist vor allem an Acetylcholin und die Adenosinderivate als gefäßerweiternde Wirkungsfaktoren zu denken.

Der Gehalt der menschlichen Plazenta an Acetylcholin ist relativ hoch (Kottlors 1929, Wrede, Strack und Bornhofen 1929, Hauptstein 1932) und nach Navratil ist für dieses Organ sogar ein eigener Acetylcholinstoffwechsel anzunehmen. An dem von uns verwendeten Material kann jedoch dem Vaguswirkstoff nur im unwesentlichen Ausmaß ein gefäßwirksamer Effekt zugesprochen werden, da nach Heirman der Acetylcholingehalt der Plazenta nach der Geburt des Kindes im Verlauf der nächsten halben Stunde stark absinkt. Dagegen kommt eine Wirkung von Adenosinderivaten wahrscheinlich schon deshalb in Betracht, weil die für unsere Extrakte verwandten Plazenten entsprechend der Vorschrift von Filatov nicht entblutet werden durften.

Bei der Natur des von uns verwendeten Materials sind aber doch wohl in erster Linie auch östrogene Substanzen für gefäßdilatierende

Teilwirkungen verantwortlich zu machen (Clauberg, Steinach, Kun und Burchardt u. a.), wobei Herrmann und MacGrath, Birkmayer und Rolleder dem Follikelhormon einen cholinergischen Wirkungseffekt zuschreiben. Der Gehalt von Normalplazenta an östrogenen Substanzen ist seit Philipp, Ehrhardt und Fischer-Wasels bekannt, nirgends aber fanden sich in der uns zur Verfügung stehenden Literatur Angaben über den Gehalt an östrogenen Wirkstoffen in autolysierter, nach Filatov aufbereiteter Plazenta. Wir stellten uns daher die Aufgabe, mit dem Östrus-Test den vermuteten unterschiedlichen Gehalt an derartigen Stoffen mit Hilfe wäßriger Auszüge aus derselben Plazenta im frischen und autolysierten Zustand zu überprüfen, was uns um so eher berechtigt schien, als gegenwärtig in immer größerem Umfang die von Filatov empfohlene Therapie mit autolysierter Plazenta in der Klinik zur Anwendung gelangt. Darüber hinaus sollte mit ebenso beschaffenen Extrakten eine etwa unterschiedliche wachstumsbeeinflussende Wirkung auf Weizenkeimlinge nachzuweisen versucht werden.

I. Tierversuche; östrogene Wirkungen.

Material und Methodik.

1. Zubereitung der Extrakte: Zur Verwendung gelangte die Plazenta einer männlichen Frucht nach regelrechtem Verlauf von Schwangerschaft und Geburt. Unter sterilen Kautelen Entnahme von 20,0 g nicht entbluteten Gewebes aus der Organmitte, das sofort in der Reibschale mit sterilem Quarzsand 10 min intensiv verrieben wird. Danach wird der Gewebsbrei mit der 10fachen Gewichtsmenge Ringer-Lösung versetzt und unter mehrfachem Filterwechsel (hart, E and D, number 613) filtriert. Ein ebenso schweres Gewebsstück derselben Plazenta wurde 8 Tage lang bei +2° C im Eisschrank unter ebenfalls sterilen Kautelen autolysiert und dann entsprechend der Originalvorschrift von Filatov aufgearbeitet.

2. Tiermaterial und Injektionsmodus: Angesetzt wurden 2 Gruppen weißer geschlechtsreifer Ratten von durchschnittlich 120,0—140,0 g Gewicht. Die Gruppe A umfaßte 10 Tiere, die nach 47tägiger Östrus-Kontrollzeit täglich mit 1,0 cm^3 wäßrigen Extraktes aus Frischplazenta 21 Tage lang subkutan gespritzt wurden. Wir wählten die subkutane Verabreichung, da nach Fels dabei mit den geringsten Hormonverlusten zu rechnen ist. Die Gruppe B, ebenfalls 10 Tiere, bekam nach einer 59tägigen Kontrollzeit tägliche subkutane Injektionen von 1,0 cm^3 wäßrigen Extraktes aus Filatov-Plazenta, insgesamt 16 Tage lang. Nach Beendigung der Injektionen wurden bei beiden Gruppen noch 2 Wochen die Zyklusverhältnisse kontrolliert. Von Kontrollinjektionen indifferenter Stoffe wurde abgesehen, da bereits Zondek, Abel und Bahr zeigten, daß solche keinen Einfluß auf den Genitalzyklus haben. Im übrigen wurden die Tiere bei gemischter, üblicher Stallkost und Zimmertemperatur gehalten.

3. Beobachtung des Östrus: Auf Grund früherer Erfahrungen mit dem Allen-Doisy-Test schien uns eine 47tägige (Gruppe A), bzw. 59 Tage lange (Gruppe B), Kontrolle (Zondek fordert 6 Wochen, Unbehaun kontrollierte 54 Tage) des individuellen Zyklus der zunächst unbehandelten Tiere ausreichend, um die durch die Extrakte bedingten Zyklusänderungen erkennen zu können. Die Vaginalabstriche wurden zweimal täglich zur selben Zeit vorgenommen und in der üblichen Weise gefärbt. Bei der Auswertung der Abstriche versuchten wir, die zyklischen

Phasen nicht nur qualitativ zu erfassen, sondern die morphologischen Bestandteile (Leukozyten, Epithelien, Schollen) in annähernden Verhältnissen auch quantitativ in grober Weise auszuwerten, derart, daß + — geringen Mengen (in der Zeichnung 1 Quadrat), ++ — großen Mengen (2 Quadrate) und +++ — reichlichen Massen (3 Quadrate) entsprechen (in der Zeichnung wurden nur Epithelien — von der Abszisse nach unten gerichtete Quadrate — und Schollen — nach oben gerichtete Quadrate — berücksichtigt).

Versuchsergebnisse.

Gruppe A (Injektionen wäßriger Extrakte aus Frischplazenta).

Ratte 1: In der 47tägigen Kontrollzeit alle 5—7 Tage 2—3tägiger Östrus. 1. Injektion fällt in Diöstrus. Am 3. Tag darauf tritt 11tägiger Daueröstrus auf, der sich nach 2tägiger Unterbrechung in einen 6tägigen, nun aber mit Epithelien vermischten Daueröstrus fortsetzt. In der Nachbeobachtungszeit am 6. Tag nach der letzten Injektion noch ein 1tägiger Östrus. Geringer Gewichtsanstieg.

Ratte 2: In der Kontrollzeit meist alle 8 Tage 1—3tägiger Östrus. 1. Injektion im Diöstrus (Übergang in Proöstrus). Daran anschließend, während der gesamten

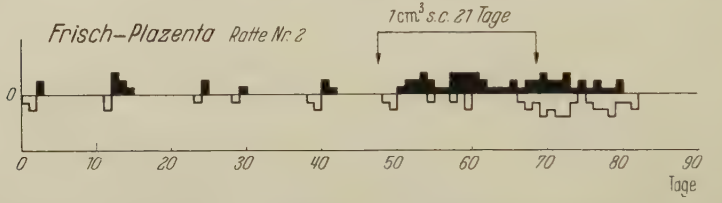


Abb. 1. 30tägiger Daueröstrus nach Applikation von wäßrigem Frischplazentaextrakt, gegen Ende der Beobachtungszeit mit Epithelien stark vermischt. (Schollen schwarze, Epithelien helle Felder).

Injektionszeit und noch 9 Tage in der Nachbeobachtungszeit anhaltender, insgesamt 30tägiger Daueröstrus, der gegen Ende stark mit Epithelien verunreinigt ist (Abb. 1). Gewicht bleibt um 138,0 g.

Ratte 3: 2—3tägiger Östrus alle 3—7 Tage in der Kontrollzeit. 1. Injektion im Proöstrus, daran anschließend 13tägiger Daueröstrus, der sich nach 1tägiger Unterbrechung in einen 9tägigen fortsetzt; dann 1 Tag ohne Schollen und erneut 3tägiger Östrus. Gegen Ende dabei zunehmende Epithelbeimischung zu den Schollen. Gewichtsanstieg von 133,0 auf 152,0 g.

Ratte 4: Vor der Behandlung sehr unregelmäßiger, 2—4tägiger Östrus. Erstinjektion im Diöstrus (?). Daran anschließend 13tägiges Dauerschollenstadium, dann 1 schollenfreier Tag, 1 Tag Schollen, wiederum 1 Tag ohne Schollen und erneut 3 Tage Schollen. In der Nachbeobachtungszeit erneut 7tägiger Östrus (starke Epithelbeimischung). Gewicht in der Kontrollzeit durchschnittlich 132,0 g, in der Injektionszeit und Nachbeobachtung durchschnittlich 148,0 g.

Ratte 5: Kontrollabstriche zeigen einen alle 5—7 Tage auftretenden 1—2tägigen, manchmal auch 3tägigen Östrus. 1. Injektion fällt in einen ersten Östrustag, am 2. und 3. Tag reichliche Schollenmassen, die am 4. Tag stark abnehmen, um dann wieder zuzunehmen; sie bleiben bis 2 Tage nach dem Absetzen der Injektionen, insgesamt 23 Tage, in wechselnden Mengen nachweisbar, sind aber am 14., 16., 17.—23. Tag mit Epithelien vermischt. In der Nachbeobachtung treten erst an den letzten beiden Tagen wieder einige Schollen auf. Geringe Gewichtsabnahme.

Ratte 6: Vor der Behandlung recht unregelmäßiger Östrus aus dem keinerlei Gesetzmäßigkeit zu erkennen ist, öfters auch 1—2tägige Epithelstadien ohne

nachfolgendes Schollenstadium. Reine Schollenbefunde nie länger als 2 Tage. Trotzdem wird das Tier im Versuch belassen, obgleich auch nicht zu erkennen ist, in welche Zyklusphase die Erstinjektion fällt. Am 2. und 3. Injektionstag vereinzelt Epithelien im Abstrich. Vom 4.—11. Injektionstag typische Schollen, wenn auch in geringen Mengen. An den letzten 4 Injektionstagen nochmals derselbe Befund, daran anschließend wieder völlig unregelmäßige Verhältnisse. Gewicht während der Gesamtversuchszeit um 141,0 g. Das Tier macht klinisch einen gesunden Eindruck.

Ratte 7: In der injektionsfreien Zeit etwa alle 4—6 Tage 1—2tägiger Östrus. 1. Injektion fällt in Metöstrus. Am 4. Injektionstag tritt 10tägiger Daueröstrus auf, der sich nach 3tägiger Unterbrechung über einen 4tägigen Proöstrus (in der Kontrollzeit nie beobachtet) in einen 3tägigen fortsetzt. In der Nachbeobachtung nochmals 3tägiger, teils mit Epithelien verunreinigter Östrus.

Ratte 8: Alle 6—8 Tage meist 2-, einmal auch 4tägiger, Östrus. 1. Injektion im Diöstrus. Bereits am 2. Injektionstag beginnt reines Schollenstadium, das 8 Tage anhält. Vom 14.—19. Injektionstag wiederum Schollen, die zunehmend stärker mit Epithelien vermischt sind. Dieses Bild wiederholt sich noch zweimal in der Nachbeobachtung, zunächst 2, dann 3 Tage lang. Gewicht in der Kontrollzeit durchschnittlich 139,0 g, in der folgenden Versuchszeit durchschnittlich 148,0 g.

Ratte 9: Schwer zu beurteilender, unregelmäßiger Zyklus, der nur einmal 2 Tage lang ein reines Schollenstadium aufweist. Soweit erkennbar, ist das Tier sonst gesund; Gewicht 132,0 g. Am 5. Injektionstag tritt Epithelstadium auf, das vom 6.—8. Tag mit anfänglich wenigen, dann reichlichen Schollen vermischt ist. Daran anschließend 2 Tage reine Schollen in großen Mengen, anschließend wiederum Epithelbeimischung, 5 Tage lang. Am letzten Injektionstag wiederum nur Epithelien, die sich 3 Tage finden, anschließend ein 2tägiger Östrus.

Ratte 10: Alle 5—7 Tage 2—3tägiger Östrus, einmal 5 Tage (!). 1. Injektion im Diöstrus (?). Bereits am nächsten Tag im Morgenabstrich Epithelien, die nachmittags mit Schollen vermischt sind. Am nächsten Tag beginnt reines Schollenstadium, das ununterbrochen 19 Tage anhält, dann 3 schollenfreie Tage und erneut reines Schollenstadium für 2 Tage, anschließend noch 1 Tag Schollen und Epithelien gemischt.

Bei aller Vorsicht, die bei der Beurteilung derartiger, individuell variierender, biologischer Wirkungsabläufe in Anwendung zu bringen ist (siehe auch die Kontroverse Besold-Blaich), glauben wir doch zu der Aussage berechtigt zu sein, daß es bei allen Tieren dieser Gruppe im Anschluß an die ersten Injektionen mit wäßrigen Extrakten aus Frischplazenta zu mehrtägigen Daueröstren, die sich zum Teil in die injektionsfreie Nachbeobachtungszeit fortsetzten, kam. Dabei ist auffallend, daß gegen Ende der Injektionszeit und während der Nachbeobachtung häufig unreine, mit kernhaltigen Epithelien vermischte Dauerschollenstadien auftreten, während zu Beginn der Injektionszeit eher „reine" Schollenöstren zur Beobachtung kommen.

Gruppe B (Injektionen wäßriger Extrakte aus Filatov-Plazenta).

Ratte 11: In der 59tägigen Beobachtungszeit ziemlich unregelmäßiger Östrus, der aber als reines Schollenstadium nie länger als 4 Tage dauert. Unreine Schollenstadien werden selten und nie länger als 1 Tag gesehen. Erstinjektion fällt in Östrus, daran anschließend 8 Tage lang unreines, mit kernhaltigen Epithelien vermischtes Schollenstadium. Gewicht um 120,0 g.

Ratte 12: Östrus alle 4—6 Tage, manchmal bis zu 4 Tagen Dauer. 1. Injektion fällt in Proöstrus, anschließend 12tägiger Daueröstrus, ohne daß die kernhaltigen Epithelien jemals ganz verschwinden. In der Nachbeobachtung nochmals 6 Tage lang starke Epithelbefunde, teilweise mit wenig Schollen vermischt. Geringer Gewichtsanstieg während der Gesamtversuchszeit.

Ratte 13: Östrus alle 4—6 Tage, meist 1—2 Tage lang. 1. Injektion im Östrus, der 2 Tage anhält, dann 1 schollenfreier Tag mit nur wenig Epithelien. Daran anschließend 13 Tage lang Schollen mit massenhaft Epithelien vermischt. In der Nachbeobachtung immer geringe bis große Mengen Epithelien; kein Östrus. Gewicht immer um 138,0 g.

Ratte 14: In der Kontrollzeit völlig unregelmäßige Zyklusverhältnisse, u. a. bis zu 5 (!) Tagen reine Schollenstadien. In welche Zyklusphase die Erstinjektion fällt, ist daher mit Sicherheit nicht auszusagen. Die Verhältnisse bleiben auch in der 16tägigen Injektionszeit wenig übersichtlich. Reine Schollen persistieren bis zu 4 Tagen; im Proöstrus vielleicht vermehrt Epithelien. In der Nachbeobachtung dasselbe Bild. Gewicht schwankt zwischen 134,0 und 146,0 g. Das Tier erscheint gesund.

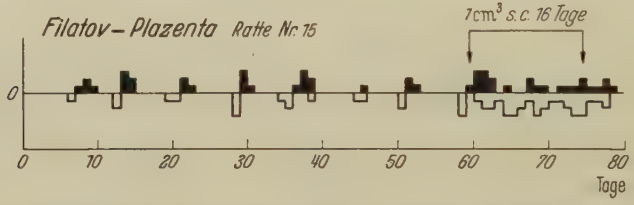


Abb. 2. Nach Applikation von wäßrigem, nach FILATOV aufbereiteten Extrakt aus derselben Plazenta bei schwächerer Schollenbildung von vornherein stärkere Epithelbeimischung.

Ratte 15: Vor der Behandlung Östrus alle 4—6 Tage, meist 2-, selten 3tägig. Erstinjektion fällt in beginnenden Östrus, der mit massenhaft, bzw. am letzten Tag mit großen Mengen Schollen, 3 Tage bestehen bleibt. Kernhaltige Epithelien finden sich täglich, insgesamt 18 Tage lang, meist in großen Mengen. Mit Ausnahme von 4 Tagen finden sich dabei aber auch immer Schollen, meist in geringen Mengen. Gewicht um 135,0 g (Abb. 2).

Ratte 16: Während der Kontrollzeit fast jeden 4. Tag meist 2tägiger Östrus, einmal 4tägiger. Erstinjektion fällt in Metöstrus. Am übernächsten Tag beginnt 4tägiger, immer mit Epithelien vermischter Schollenbefund. Anschließend finden sich in jedem Abstrich bis zum Ende der Gesamtversuchszeit kernhaltige Epithelien in wechselnden Mengen, völlig unregelmäßig mit Schollen bis zu 3 Tagen vermischt. Gewicht immer um 152,0 g.

Ratte 17: Alle 6—8 Tage meist 2tägiger Östrus. Erstinjektion im Diöstrus. Am 3. Injektionstag beginnt Schollenstadium, das 4 Tage anhält und nur am 2. Tag „reine" Schollen aufweist. Die Epithelien bleiben nach dem Verschwinden der Schollen bestehen, über ein kurzes Leukozytenstadium hinaus für 10 Tage, ohne daß erneut Schollen auftreten. 3 Tage nach der letzten Injektion nochmals 2tägiger Östrus wie in der Kontrollzeit. Geringe Gewichtszunahme (von 129,0 auf 141,0 g).

Ratte 18: Recht unregelmäßiger, 1-, höchstens 2tägiger Östrus, häufig auch nur für 1—2 Tage Epithelien, ohne nachfolgende Schollen. In welche Zyklusphase Erstinjektion fällt, nicht bestimmbar. Am 3. Injektionstag beginnt Epithelstadium, das 7 Tage anhält und am 5. Tag mit wenig Schollen vermischt ist. In der Nachbeobachtung wieder völlig unübersichtliche Verhältnisse. Gewicht um 112,0 g.

Ratte 19: Östrus bis zu 3 Tagen dauernd, zwischenöstrische Phasen schwanken zwischen 4 und 7 Tagen. Erstinjektion im Diöstrus. Darauf am 2. Injektionstag zunächst 3 Tage reines, dann 2 Tage mit Epithelien vermischtes Schollenstadium. Vom 7.—10. Injektionstag Epithelien und Leukozyten, anschließend noch 2 Tage nur Epithelien, die am 15. und 16. (letzten) Injektionstag wiederum auftreten, 1 Tag ausbleiben und — nun mit wenig Schollen vermischt — nochmals 2 Tage nachweisbar sind. Gewicht um 136,0 g.

Ratte 20: Zeigt 1—2tägigen Östrus mit durchschnittlich 6tägigen zwischenöstrischen Phasen. Erstinjektion fällt in den 2. Tag eines Schollenstadiums. Darauf am 2. und 3. Injektionstag Leukozyten, vermischt mit Epithelien, am 4. und 5. nur Epithelien, zu denen sich am 6. reichlich, am 7. nur spärliche Mengen Schollen gesellen, und die weiterhin in wechselnden Mengen bis zum 10. Injektionstag noch nachweisbar sind. 2 Tage nach der letzten Injektion wieder ein 2tägiger Östrus. Gewicht um 147,0 g.

Unter dem Einfluß täglich injizierter wäßriger Extrakte aus derselben, nunmehr aber autolysierten Plazenta kommt es zu deutlich unterschiedlichen Zyklusveränderungen: So werden wohl noch mehrtägige Schollenstadien beobachtet, aber längst nicht mehr in der bei der Gruppe A gesehenen Regelmäßigkeit. Auch sind die Daueröstren dieser Gruppe B zeitlich von geringerer Ausdehnung und stellen sich selten als „reine" Schollenstadien dar. Dagegen wird das Gesamtbild nunmehr deutlich von den Epithelien beherrscht, die, durchweg vermehrt, in ihrem zeitlichen Auftreten im Rahmen des kritisch überprüften individuellen zyklischen Phasenablaufes am ehesten noch als verlängerte Proöstri zu deuten sind.

Besprechung.

In Bestätigung der längst bekannten Befunde von Ehrhardt und Fischer-Wasels (1936) über den Gehalt von Frischplazenta an östrogenen Substanzen ergibt sich im Unterschied dazu an Hand der von uns getroffenen Versuchsanordnung, daß der östrogene Effekt wäßriger Extrakte aus derselben Plazenta im autolysierten Zustand deutlich vermindert ist. Dies würde bedeuten, daß der Gehalt der Filatov-Plazenta an vasodilatatorischen Substanzen sexualhormonaler Provenienz geringer zu veranschlagen wäre, was gut mit der von uns früher gefundenen Tatsache übereinstimmt, daß die arterienverengernde Wirkung der autolysierten Plazenta am Krawkow-Präparat eher noch stärker ausgeprägt ist als bei der Durchströmung mit Frischplazentaextrakt.

Es muß aber im Auge behalten werden, daß in wäßrigen Extrakten aus autolysierter Plazenta ein östrogen wirksamer Effekt in gewissem Ausmaß doch noch vorhanden ist, wie aus der im Anschluß an die Injektionen auftretenden vermehrten Proliferation kernhaltiger Epithelien bei solcherart behandelten Tieren hervorgeht. Ähnliche Befunde treten bemerkenswerterweise auch gegen Ende der Injektionszeit bei den Tieren der Gruppe A (Frischplazenta-Extrakt) auf, wobei aber nicht mit Sicherheit zu entscheiden ist, ob dafür eine durch eine gewisse Autolyse

bedingte Verminderung an östrogenen Substanzen der während der Injektionszeit im Eisschrank aufbewahrten Extrakte verantwortlich gemacht werden kann. Diese persistierenden Epithelstadien lassen sich als verlängerte Proöstri nur so deuten, daß der in autolysierter Plazenta noch vorhandene Gehalt an östrogenen Wirkstoffen gewissermaßen zur Erreichung des reinen Schollenstadiums, das nach Zondek — dessen Ansicht wir uns hier anschließen — allein für den Östrus charakteristisch sein soll, nicht mehr ausreicht; es würde sich also dabei um eine Art durch verminderte Hormonwirkung bedingte „Reifungshemmung" der Epithelien im Ablauf des östrischen Geschehens handeln. Unsere Befunde stehen damit im Widerspruch zu der Ansicht von Hechter, Lev und Soskin, die als spezifische Östrinwirkung lediglich die Epithelproliferation auffassen, während — unter anderen Genitalveränderungen — die vaginale Verhornung allein schon durch die Hyperämie stimuliert werden soll. Entsprechend dieser Auffassung müßte dann auf Grund der unter Einfluß von autolysierter Plazenta eintretenden Epithelproliferation gerade umgekehrt ein *höherer* Gehalt der autolysierten Plazenta an östrogenen Substanzen postuliert werden, was mit unseren anderen Ergebnissen nicht vereinbar ist, abgesehen davon, daß es wohl schwer fiele, die daraus zu folgernde Hormon*mehr*bildung im Verlauf eines autolytischen Prozesses plausibel zu machen. In der Deutung unserer Befunde nehmen wir vielmehr mit Reist, der die von Saurer beobachteten Blutungen bei Kastratinnen nach geringer Follikulinmedikation nicht auf eine Schleimhautwirkung, sondern auf einen Blutgefäßeffekt zurückführt, an, daß bei derart verminderter Hormonzufuhr wohl schon eine Hyperämie und Epithelproliferation gewährleistet, ein *Voll*östrus dagegen doch nicht mehr erreicht wird. Da nach Sausse, Larizza u. a. bereits nach verhältnismäßig geringen Dosen östrogener Sexualhormone auch schon eine bessere Durchblutung der Peripherie eintritt, wären die nach der Autolyse in solchem Plazentagewebe vorliegenden quantitativen Wirkstoffverhältnisse für die therapeutische Anwendung — soweit die vorliegenden, an Ratten erhaltenen Ergebnisse eine Übertragung auf den Menschen gestatten — nur günstig, da bei verminderter sexualhormonspezifischer Vollwirkung der hyperämisierende Teileffekt erhalten bliebe und sich so zu der an den *post*arteriellen Gefäßprovinzen gleichgerichteten Histaminwirkung hinzuaddieren würde, während kaum zu befürchten wäre, daß bei langdauernder Applikation ähnliche Schäden wie bei chronischer Follikelhormoneinwirkung (Zusammenstellung bei v. Wattenwyl) auftreten.

II. Pflanzenversuche; Wachstumswirkungen.

So zahlreich pflanzenphysiologische Untersuchungen über Wachstumsbeeinflussung durch Sexualhormone in der Literatur vorliegen

— erste derartige Beobachtungen sind nach Aschheim aus Vs. II, 2—6 des großen medizinischen Papyrus des Berliner Museums ersichtlich — (Zusammenstellung bei Schmidt-Thomé), so spärlich sind die Berichte über solche Wirkungen der *Gesamt*plazenta. Soweit wir sehen, hat Brandt (1935) erstmalig einschlägige Untersuchungen angestellt, der mit Plazentatrockenpulver eine deutliche Beschleunigung der Kaulquappenmetamorphose erzielen konnte. Bangerter, Ludwig und v. Ries (1948) wiesen mit derselben Substanz sowie mit wäßrigen Plazentaextrakten beschleunigte Entwicklung von Seeigeleiern und Kaulquappen und Wachstumsanregung von Weizenkeimlingen nach, wofür sie besondere Wirkstoffe verantwortlich machen. Ob solche Wirkungen auch wäßrige Extrakte aus Filatov-Plazenta hervorrufen können, versuchten wir an Hand nachfolgend beschriebener Versuchsanordnung zu klären.

Methodik.

Die Extrakte wurden von derselben Plazenta in der beschriebenen Weise hergestellt, aber diesmal im Verhältnis 1:100 mit Ringer-Lösung verdünnt. Die Versuche konnten nicht gleichzeitig ausgeführt werden, da wegen einwandfreier Vergleichsmöglichkeiten beide Extrakte unbedingt aus *derselben* Plazenta gewonnen werden mußten und damit zu rechnen war, daß der Frischplazentaextrakt in der Zeit, während welcher der andere Plazentaanteil autolysierte, trotz geeigneter Aufbewahrung ebenfalls Veränderungen autolytischer Art erlitt. Es muß aber betont werden, daß für beide Versuche soweit wie nur irgend möglich dieselben Temperatur- und Lichtverhältnisse gewährleistet waren (Monat Oktober, anhaltende Hochdruckperiode). Mit beiden Extraktversuchen liefen Kontrollen, die mit denselben Mengen Aqua dest. beschickt wurden. Angesetzt wurden für jeden Extrakt und für die Kontrollen je 3 Petrischalen (in Ermangelung geschlossener Keimschalen), die mit feingesiebter, getrockneter Ackererde beschickt (nach Schoeller und Goebel kommt eine Adsorption wichtiger Hormone durch Erde nicht in Frage) und mit etwa 50 Weizenkörnern bestreut wurden. Alle 6 Schalen wurden zunächst mit Aqua dest. zum Keimen gebracht, was am 4. Tag in ungefähr gleichem Ausmaß der Fall war. Dann bekamen 3 Schalen täglich 2mal 5,0 cm^3 wäßrigen Frischplazentaextrakt, die anderen 3 nur Aqua dest. In derselben Weise wurde 10 Tage später mit wäßrigem Extrakt aus autolysierter Plazenta verfahren. Nach 7 Tagen wurden in beiden Gruppen die Versuche abgebrochen, die Halmlängen gemessen und im Mittel errechnet.

Ergebnisse und Besprechung.

Tabelle 1.

	Frischpl.	Kontrolle	Filatov-Pl.	Kontrolle
Mittlere Halmlänge . .	12,8 cm	10,3 cm	9,6 cm	10,1 cm

Wie ersichtlich, fördern wäßrige Extrakte aus Frischplazenta das Wachstum von Weizenkeimlingen, während ebensolche Auszüge aus autolysierter Plazenta in derselben Verdünnung (1:100) eher eine Hemmung bewirken. Weitere Versuche, mit denen eine Ausschaltung dieses hemmenden Effektes mit Hilfe fortschreitender Verdünnungen im Ver-

gleich zu reiner RINGER-Lösung geplant war, mußten wir uns aus äußeren Gründen leider versagen.

Die sich hier sofort aufdrängende Frage, welche Substanz im Frischplazentaextrakt für die Wachstumsförderung und welche im FILATOV-Plazentaextrakt für die Wachstumshemmung verantwortlich zu machen ist, kann unsere Versuchsanordnung selbstverständlich nicht beantworten. Lassen wir die in der Plazenta festgestellten Vitamine, Aminosäuren, Fermente und Hormone — außer denen mit östrogener Wirksamkeit — in diesem Zusammenhang außer Betracht, so dürften doch folgende Überlegungen erlaubt sein: Die wachstumsfördernde Wirkung von Frischplazentaextrakt könnte mit SCHARRER und SCHROPP als Follikelhormonwirkung erklärt werden, ohne daß man zur Annahme eines besonderen Wachstumsfaktors in solchen Extrakten gezwungen wäre. Inwieweit darüber hinaus andersartige, gegenwärtig aber wohl noch hypothetische Wirkungsmechanismen, so die in Anlehnung an DIEZFALUSY und EULER von ORTMANN unter anderem als wachstumsreizauslösende Substanzen gedeuteten „im basalen Trophoblasten reichlich gebildeten Nukleinsäuren" (ORTMANN), eine Rolle spielen, soll hier nicht weiter diskutiert werden, zumal eine Prüfung unserer Extrakte auf Nukleinsäuregehalt nicht vorgenommen worden war. Es wäre meines Erachtens aber auch in Erwägung zu ziehen, in welchem Ausmaß Histamin eine entsprechende Wirkung entfalten könnte. BANGERTER und Mitarbeiter geben, ohne im Text etwas davon zu erwähnen, eine Abbildung über Histaminwirkung auf Weizenkeimlinge, aus der hervorgeht, daß Histamin ebenfalls einen wachstumsfördernden Einfluß ausübt, der den von Plazentatrockenpulver fast zu erreichen scheint. Die wider Erwarten von uns beobachtete wachstumshemmende Wirkung der Extrakte aus autolysierter Plazenta — man hätte auf Grund unserer früheren Ergebnisse über den Gehalt solcher Auszüge an Histamin (gegenüber Frischplazenta eher erhöht) und an östrogenen Stoffen (gegenüber Frischplazenta vermindert) an einen fördernden Effekt denken können — zwingt daher zu der Annahme, daß entweder im Verlauf des Autolysierungsprozesses neu entstandene wachstumshemmende Substanzen oder quantitative Verhältnisse gegeneinander konkurrierender wachstumsfördernder und -hemmender Faktoren hierfür die entscheidende Ursache sind. Anhaltspunkte dafür, daß mit solchen quantitativ-qualitativen Konkurrenzverhältnissen zu rechnen ist, geben FELLNER, der in der Plazenta ein wachstumsförderndes, wasserlösliches Lipoid und einen nichtlipoiden wachstumshemmenden Körper annimmt, und HEILMEYER mit dem Hinweis, daß hohe Dosen östrogener Stoffe zytostatisch wirken. Bei weiteren, diese Verhältnisse abklärenden Versuchen, müßte daher der Frage der Dosierung besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden.

Zusammenfassung.

1. Gegenüber wäßrigen Auszügen aus Frischplazenta ist der östrogene Effekt ebensolcher Extrakte aus derselben Plazenta im autolysierten Zustand (Vorschrift nach Filatov) deutlich verringert (Östrus-Test an geschlechtsreifen, weißen Ratten), bewirkt aber doch noch vermehrte Epithelproliferationen, die als verlängerte Proöstri gedeutet werden.

2. Im Zusammenhang damit machen es theoretische Überlegungen und früher gewonnene experimentelle Einsichten wahrscheinlich, daß bei verminderter sexualspezifischer Totalwirkung eine gewisse, durch östrogene Substanzen bedingte, hyperämisierende Teilwirkung in solchen Extrakten noch vorhanden ist.

3. Wäßrige Extrakte aus frischer Plazenta in der Verdünnung 1:100 fördern das Wachstum von Weizenkeimlingen, während ebensolche aus derselben Plazenta im autolysierten Zustand gewonnenen Auszüge eher einen hemmenden Einfluß ausüben.

Literatur.

Abel: Arch. Gynäk. **147** (1931). — Bahr: Arch. Gynäk. **147** (1931). — Bangerter, Ludwig, u. v. Ries: Schweiz. med. Wschr. **1948**, 37. — Besold: Klin. Wschr. **1949**, 510. — Birkmayer u. Rolleder: Wien. klin. Wschr. **1949**, 324. — Blaich: Klin. Wschr. **1949**, 511. — Brandt: Med. Klin. **1935**, 1674. — Clauberg: Zbl. Gynäk. **1936**, 145. — Hdb. d. Gynäk. herausgeg. v. W. Stoeckel, **9**, 965. München, J. F. Bergmann, 1936. — Diezfalusy u. v. Euler: zit. bei Ortmann. — Ehrhardt u. Fischer-Wasels: Zbl. Gynäk. **1936**, 787. — Fellner: Dtsch. med. Wschr. **1924**, 40. — Fels: Rev. méd.-quir. Pat. fem. **13**, 665 (1939). — Filatov: „Opitscheskaja peresadka rogowizi i tkanewaja terapija". Moskau, Med. tis 1945. — Hauptstein: Arch. Gynäk. **160**, 543 (1936). — Hechter, Lev u. Soskin: Endocrinology **26**, 73 (1940). — Heilmeyer: Klin. Wschr. **1948**, 97. — Acta haematologica Vol. **2**, 25 (1949). — Heirman: Arch. intern. Physiol. **51**, 85 (1941). — Herrmann u. MacGrath: Arch. Surgery **40** (1940). — Korting u. Uebel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 35 (1949). — Kottlers: Zbl. Gynäk. **1929**, 2987. — Kun u. Burchardt: Pflügers Arch. **230**, 776 (1933). — Larizza: zit. bei v. Wattenwyl. — Navratil: Klin. Wschr. **1939**, 963. — Ortmann: Z. f. Zellforschg. u. mikr. Anat. **34**, 562 (1949). — Philipp: Zbl. Gynäk. **8/9**, 1930. — Dtsch. med. Wschr. **1932**, Nr. 6. — Reist: Schweiz. med. Wschr. **1949**, 288. — Saurer: Schweiz med. Wschr. **1949**, 288. — Sausse: Zbl. Gynäk. **1940**, 2090. — Scharrer u. Schropp: zit. bei Schmidt-Thomé. — Schmidt-Thomé: Erg. d. Physiol. **39**, 192 (1937). — Schoeller u. Goebel: Biochem. Z. **1931**, 240. — Steinach: Wien. klin. Wschr. **1936**, 164. — Unbehaun: Arch. Gynäk. **147** (1931). — v. Wattenwyl: „Tierexperimentelle Untersuchungen über die Wirkung langdauernder Follikelhormonapplikation und die hormonale Tumorentstehung" Basel, Benno Schwabe 1944. — Zondek: „Die Hormone des Ovars und des Hypophysenvorderlappens". Berlin, J. Springer 1935.

Dr. Horst Uebel, Patološko-anatomski institut, Medicinski Fakultet, *Skopje/N. R.* Makedonija, Jugoslavija.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 468—472 (1950).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Frankfurt am Main
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Franz Volhard).

Zur Wirkung von Nitrit auf rote Blutzellen des Menschen.

II. Mitteilung.

Von

Peter Moser.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 9. 12. 1949.)

In einer früheren Mitteilung konnte gezeigt werden, daß bei experimenteller Nitritvergiftung am Menschen salpetrige Säure sich mit dem Blutfarbstoff im Verhältnis von 1:0,9 umsetzt und daß nach Reduktion des oxydierten Farbstoffs in der Zelle noch eine Veränderung der osmotischen Resistenz, des „leicht abspaltbaren Bluteisens", der Aktivität des Fermentes Carboanhydrase und der Sauerstoff- und Kohlensäurebindung festzustellen war, welche die Reduktion des Hämiglobins überdauerte. Diese Veränderungen wurden durch einen p_H-Effekt erklärt, welcher Ausdruck des Wasserstoffionen liefernden Stoffwechsels der Zelle sei.

Verschiebungen der osmotischen Resistenzkurve ließen die Vermutung zu, daß der oxydative Eingriff nicht in allen Zellen gleichmäßig abliefe. Andere Faktoren, wie Alter der Zelle, quantitative oder qualitative Änderungen des Zellstoffwechsels konnten von Einfluß auf die Hämiglobinbildung und Hämiglobinreduktion sein. Diese gewinnen klinische Bedeutung, sobald eine Zellvariante wie beim angeborenen hämolytischen Ikterus oder eine Verschiebung des Zellalters wie bei regeneratorischen Anämien vorliegt. Bei Fällen von hämolytischem Ikterus mit den Zeichen einer chronischen Regeneration im Blutbild wird bei dosisgleicher Nitritgabe pro kg Körpergewicht nur etwa halb soviel Hämiglobin gebildet. Da bei diesen Fällen vom 3.—9. Tage nach der Nitritgabe eine hämolytische Krise einsetzte, wurde die geringere Hämiglobinbildung durch eine geringere Füllung der Zelle mit reifen, oxydationsfähigen Hämen erklärt und eine Oxydation am Nichthämoglobineiweiß als Ursache des Zellzerfalls angenommen. Die Jugend der Zellpopulation bei dieser Krankheit mit den Zeichen einer *chronischen* Regeneration ist neben der besonderen Zellform (Sphärozyten) von Bedeutung.

Das Maximum einer Hämiglobinämie ist jedoch nicht allein abhängig von der Anzahl oxydationsfähiger Häme pro Zelle, sondern ist nach Kiese das Produkt der Reaktionsgeschwindigkeiten von Hämiglobinbildung und Hämiglobinreduktion. Bei dem bekannten Unterschied eines mehr oxydativen Stoffwechsels junger Blutzellen gegenüber der Glykogenolyse reifer Blutzellen konnten sich verschiedene Gleichgewichte ausbilden je nach der Altersverteilungskurve einer Zellpopulation.

Es wurde daher einerseits das Verhalten der roten Zellen bei klinisch und hämatologisch gesunden Rekonvaleszenten bei wiederholter Nitrit-

belastung untersucht und andererseits diese „Stoffwechselbelastung des Erythrocyten" auf Anämien und Hepatitiden ausgedehnt, über deren Ergebnis berichtet werden soll.

Die Methode war die gleiche wie in früheren Mitteilungen. Jedoch wurden niedrigere Nitritdosen — meist 400 mg pro dosi, bzw. 7—8 mg/kg bei 50—60 kg schweren Personen — angewandt und die Dosis in physiologischer Kochsalzlösung gelöst intravenös innerhalb 1—2 min eingespritzt. Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen wurde ausschließlich Capillarblut aus der Fingerbeere in einer Verdünnung von 0,1/25 ml Blut/Aqua dest. verwandt, dem nach der Hämolyse etwa 20 Vol% Puffer p_H 6,8 zugegeben wurde. Herz- und Kreislaufkranke wurden wie bisher ausgeschlossen.

Da die Funktion der Zelle nach Reduktion des Hämiglobins noch nicht völlig wiederhergestellt ist, so konnte eine Differenz in der Höhe der Hämiglobinämie bei einer zweiten Belastung mit gleicher Dosis um so eher erwartet werden, je kürzer der Zeitabstand zwischen den Belastungen gewählt wurde. Die Ergebnisse gehen aus Tab. 1 hervor.

Tabelle 1. *Wiederholte Belastung mit Natriumnitrit bei Gesunden.*

Fall	Datum	Hb^{++} g%	Hb^{+++} g%	Dosis mg	mMol/kg	Hb^{+++} g% max.	mVal/kg*	Val/Mol
Sche. ♀ 39 J.	7. 9. 49	13,5	0,10	500	0,103	2,20	0,092	0,89
70,4 kg	10. 9. 49	14,0	0,10	400	0,082	2,21	0,091	1,10
Os. ♀ 22 J.	7. 9. 49	14,5	0,05	500	0,140	3,10	0,130	0,93
52,4 kg	9. 9. 49	13,5	0,07	400	0,110	2,47	0,102	0,93
De. ♀ 47 J.	9. 9. 49	13,2	0,03	500	0,133	3,00	0,124	0,93
54 kg	12. 9. 49	14,0	0,07	500	0,133	2,77	0,115	0,87
Ce. ♀ 22 J.	30. 9. 49	14,5	0,07	250	0,065	0,78	0,032	0,49
55,7 kg	3. 10. 49	15,5	0,07	400	0,104	1,80	0,074	0,71
	5. 10. 49	15,5	0,07	400	0,104	2,33	0,096	0,94
	13. 10. 49	15,0	0,05	400	0,104	2,55	0,105	1,03
Gr. ♀ 20 J.	3. 10. 49	12,6	0,07	400	0,091	1,90	0,078	0,86
63 kg	6. 10. 49	12,6	0,07	400	0,091	2,25	0,092	1,01
Ge. ♀ 24 J.	4. 10. 49	14,3	0,05	500	0,115	3,00	0,123	1,07
62 kg	6. 10. 49	14,2	0,05	400	0,093	2,40	0,099	1,06
	14. 10. 49	14,3	0,05	400	0,093	2,25	0,093	1,00
	26. 10. 49	14,0	0,07	400	0,093	2,10	0,087	0,93
La. ♀ 53 J.	14. 10. 49	12,9	0,05	400	0,084	1,72	0,071	0,85
68,7 kg	21. 10. 49	12,9	0,05	400	0,084	2,40	0,099	1,18
	27. 10. 49	12,8	0,07	400	0,084	2,30	0,094	1,12
	3. 11. 49	12,8	0,05	400	0,084	2,40	0,099	1,18
En. ♀ 27 J.	19. 10. 49	13,5	0,07	400	0,090	2,05	0,084	0,93
64,5 kg	21. 10. 49	13,5	0,07	400	0,090	2,70	0,110	1,22
	26. 10. 49	13,4	0,05	400	0,090	2,25	0,092	1,02
	31. 10. 49	12,9	0,05	400	0,090	2,05	0,084	0,93
Kle. ♀ 35 J.	21. 9. 49	12,1	0,07	400	0,107	2,70	0,112	1,05
53,6 kg	23. 9. 49	12,2	0,07	400	0,107	3,08	0,126	1,18

* Berechnet unter der Annahme eines Äquivalentgewichtes von 17000 Hb/4 und 70 cm^3 Blut je kg (Mindestwerte).

Wenn auch die Zahl der Fälle zu klein ist, um eine statistisch gesicherte Abweichung zu erfassen, so scheint mir doch, daß die mittlere Abweichung des Val/Mol-Verhältnisses bei einem Zeitintervall von 2 bis 3 Tagen zwischen den dosisgleichen Belastungen um 0,1 häufiger zunimmt, als bei einem längeren Zeitintervall. Dies könnte auf einer Beschleunigung der Hämiglobinbildung ebenso wie auf verzögerter Rückbildung oxydierten Farbstoffs beruhen.

Man könnte sich vorstellen, daß die Geschwindigkeit der Oxydation der Hämoglobinmoleküle in der Zelle mit zunehmender Konzentration an Hämiglobin innerhalb der Zelle abnähme und daß die Geschwindigkeit nicht in allen Zellen gleich sei. Dies ist wahrscheinlicher als die völlig unbewiesene Annahme eines „Alles oder Nichtsgesetzes der Oxydation" innerhalb der Zelle, was höchstens absterbenden Blutzellen zugebilligt werden könnte. Da fortwährend gebildetes Hämiglobin durch den Stoffwechsel der Zelle zu gleicher Zeit reduziert wird (HEUBNER, KIESE und Mitarbeiter), so ist die Intensität des Stoffwechsels für das experimentelle Hämiglobinmaximum maßgebend. In analoger Weise könnte dies für die Oxydation der einzelnen Häme im Hb-Molekül zutreffen, für welche KIESE und KLINGMÜLLER nachwiesen, daß bei Oxydation partiell oxydierte Molekeln auftreten. Die Verteilung der Molekeln in der Zelle, d. h. das Verhältnis der Gewichtsmenge zur Volumkonzentration scheint hier eine Rolle zu spielen. Wir möchten annehmen, daß der die Reduktion des Hämiglobins überdauernde Wasserstoffionen liefernde Zellstoffwechsel zu einer p_H-Änderung innerhalb der Zelle führt, welche die stärkere

Tabelle 2. *Experimentelle Nitritbelastung bei Anämie und Hepatitis.*

Diagnose	Datum	Hb^{++} g%	Hb^{+++} g%	Dosis mg	mMol/kg	Hb^{+++} g% max.	mVal/kg	Val/Mol
Hepatitis*	7. 9.49	14,2	0,13	400	0,107	2,55	0,105	0,98
♀ 32 J. 54, 4 kg	9. 9.49	14,0	0,05	400	0,107	3,81	0,156	1,50
Hepatitis	8. 9.49	13,5	0,07	400	0,103	3,30	0,135	1,30
♀ 47 J. 56,4 kg	10. 9.49	13,9	0,05	400	0,103	2,85	0,118	1,15
Hepatitis	3.10.49	12,5	0,07	200	0,046	1,00	0,041	0,91!
♀ 25 J. 62,7 kg	5.10.49	12,3	0,09	400	0,070	2,55	0,105	1,50
Angeborener hämol. Ikt. ♀ 39 J. 51.7 kg	27.10.49	10,0	0,05	400	0,112	1,90	0,078	0,71
Erworbener hämol. Ikt. ♀ 51 J. 52,5 kg	24.10.49	8,1	0,05	400	0,110	1,90	0,078	0,71
Eisenmangel-anämie ♀ 41 J. 62,5 kg	24.10.49	9,0	0,05	400	0,092	1,70	0,070	0,76
Plasmocytom	12. 9.49	11,4	0,05	300	0,076	1,10	0,047	0,60
sec. Anämie	7.10.49	11,8	0,05	400	0,105	1,90	0,078	0,74
♀ 54 J. 55 kg	13.10.49	12,2	0,07	400	0,105	2,70	0,112	1,07

* Die 32jährige und die 47jährige Patientin zeigten im histologischen Schnitt des Leberpunktates das Bild der Hepatitis epidemica. Die 25jährige Pat. war nach Befund und Verlauf ebenfalls eine Hepatitis epidemica.

Hämiglobinbildung bei dosisgleicher wiederholter Belastung begünstigt. Dies scheint mit Befunden von Heubner und Weist in einer guten Übereinstimmung zu sein, welche fanden, daß nach „Säuerung" von Ratten mit Salmiakfütterung oder Salmiakinjektion es zu einer Verschiebung der Wasserstoffzahl in der Zelle kommt, welche die intrazelluläre Hämiglobinbildung begünstigt. Ob es in unseren Belastungen zu einer echten Erhöhung der Wasserstoffzahl in der Zelle kommt, oder die Beanspruchung der Pufferkapazität des Hämoglobins das Entscheidende ist, können wir nicht beurteilen.

Bei einem Gehalt von 12—15 g% Hämoglobin unserer Versuchspersonen trat eine Abhängigkeit der Hämiglobinbildung von der Hämoglobinkonzentration bei den relativ hohen Nitritdosen nicht in Er-

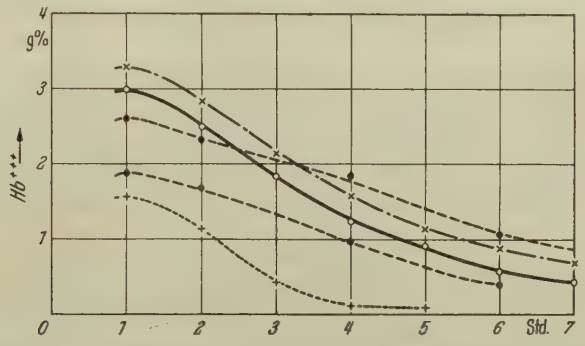


Abb. 1. Abnahme der Hämiglobinbildung nach i.v. Nitritgabe beim Menschen. ○———○ Normalpersonen, ×.....× Anämien, ●– – – –● Hämolyt. Ikterus, und ×– · –× Hepatitis epidemica c. ictero.

scheinung. Bei einigen wenigen Fällen von Anämie mit einem Hämoglobingehalt von 8—11 g%, welche in Tab. 2 aufgeführt sind, ist bei annähernd gleicher Nitritdosis jedoch eine geringere maximale Hämiglobinbildung sichtbar. Nach Kiese und Soetbeer nimmt die mittlere Wirksamkeit der einzelnen Molekel Nitrit mit Verringerung der Dosis zu, und 1 Mol Nitrit oxydiert bis 5 Äquivalente Hämoglobin. In unserem Ansatz ist die Nitritmenge zu groß, um diesen Effekt wirksam werden zu lassen. Die geringere Hämiglobinbildung bei anämischen Patienten dürfte auf dem relativ hohen Gehalt an jüngeren Zellelementen beruhen und es dürfte die Annahme gerechtfertigt sein, daß der Reduktionsstoffwechsel der jüngeren Zellen infolge schnellerer Reduktion das erreichbare Hämiglobinmaximum senkt.

Da Anämien, resp. Oligocythämien durch Erhöhung der zirkulierenden Blutmenge und der Blutumlaufgeschwindigkeit den Sauerstoffbedarf des Organismus kompensieren, könnte die Geschwindigkiet der Hämiglobinreduktion durch Faktoren der Strombahn beeinflußt werden. Der Verlauf der Rückbildung des Hämiglobins beim Menschen entspricht weitgehend den Befunden von Jung (Katze), Kiese und Weis, Kiese und Soetbeer (Hund) und ist — abgesehen von der jeder Tierart eigenen maximalen Hämiglobinbildung und ihrer Reduktion — abhängig von der Höhe der erreichten Hämiglobinkonzentration.

Bei normalen Versuchspersonen ist nach 6—7 Stunden über 80% des oxydierten Blutfarbstoffs zurückgebildet. Bei Anämischen entsprechend der geringeren Hämiglobinbildung bereits nach 4 Stunden. Eine Ausnahme bildet jedoch der angeborene hämolytische Ikterus mit den morphologischen Kriterien der Sphärocytose. Wie aus Abb. 1 hervorgeht, ist die Geschwindigkeit der Rückbildung bei den Sphärocyten wesentlich herabgesetzt.

Die Ursache für diese Besonderheit dürfte in einer Stoffwechselvariante der Sphärocyten vermutet werden, die mit einer hohen Hämoglobinkonzentration von 35—40% bei normaler oder herabgesetzter Hämoglobinmenge von etwa 30 $\gamma\gamma$ pro Zelle einhergeht. Nur bei einem Fall von Polycythämia vera (Hb 19 g%, Ery 6400000) haben wir außerdem 1 mal eine verzögerte Rückbildung des Hämiglobins gesehen.

Sehr bemerkenswert ist die starke Hämiglobinbildung bei Kranken mit Hepatitis epidemica. Die Werte liegen bei etwa dosisgleicher Belastung erheblich oberhalb der Dosiswirkungskurve des Normalen. Dies legt die Vermutung nahe, daß der Stoffwechsel der roten Zellen herabgesetzt ist oder in andere Bahnen gelenkt wurde.

Zusammenfassung.

Bei wiederholter dosisgleicher Nitritbelastung, die in einem Intervall von mehr als 5 Tagen nach der ersten Belastung vorgenommen wurde, wird bei Gesunden annähernd die gleiche Hämiglobinkonzentration erreicht. Wird die Nitritbelastung jedoch 2—3 Tage nach einer ersten Belastung wiederholt, so liegt das Hämiglobinmaximum in über der Hälfte der Fälle höher als bei der ersten Belastung und die mittlere Abweichung des Val/Mol-Verhältnisses nimmt um 0,1 zu.

Bei Anämien mit einem Hb-Gehalt von 8—11 g% wird bei gleicher Nitritdosis weniger Hämiglobin gebildet.

Bei Kranken mit Hepatitis epidemica und einem Gesamt-Hb-Gehalt von 12—14 g% liegen die Werte des gebildeten Hämiglobins im Mittel etwa 25% höher wie bei Normalpersonen. Die Ursache für diese Unterschiede wird in quantitativen oder qualitativen Stoffwechseländerungen der Zellen vermutet.

Literatur.

Gelinski: Arch. exp. Path. (D) **195**, 460 (1940). — Heubner, W.: Erg. Physiol. **43**, 9 (1940). — Heubner, W., u. H. Weist: Arch. exp. Path. (D) **207**, 324 (1949). — Jung, F.: zit. n. Heubner (1940). — Jung, F., u. H. Remmer: Arch. exp. Path. **206**, 459 (1949). — Kiese, M.: Klin. Wschr. **1947**, S. 545. — Arch. exp. Path. (D) **204**, 288 (1947). — Kiese, M., u. G. Klingmüller: Arch. exp. Path. **207**, 655 (1949). — Kiese, M., u. M. Soetbeer: Arch. exp. Path. (D) **207**, 347 (1949). — Kiese, M., u. W. Schwartzkopff: Arch. exp. Path. (D) **204**, 267 (1947). — Kiese, M., u. B. Weis: Arch. exp. Path. (D) **202**, 493 (1943). — Moser, P.: Arch. exp. Path. (D) **210**, 39. 60 (1950). — Helvet. Med. Acta **16**, 594 (1949).

Dr. Peter Moser, Frankfurt/M., Med. Univ.-Klinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 473—478 (1950).

Aus der Medizinischen Univ.-Klinik Jena (Direktor: Prof. Dr. med. W. Brednow).

Über die Affinität des Urethans zu verschiedenen Zellformen des normalen und leukämischen Blutes.

Von
Albrecht Beickert.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 28. Januar 1950.)

Das Urethan gehört zu jener Gruppe von Stoffen, die Heilmeyer — in Anlehnung an den Begriff der Bakteriostase — „cytostatische Stoffe" genannt hat. Es sind dies Antibiotika, die in den Stoffwechsel der Körperzellen „so eingreifen, daß die Vermehrung der Zellen eingeschränkt und die Zellteilung gehemmt wird", wobei dahingestellt bleibt, ob es sich um eine mitotrope oder irgendeine sonstige Wirkung handelt[1].

Therapeutisch nutzbar werden die Cytostatica erst dadurch, daß sie alle eine mehr oder minder spezifische Wirkung auf ganz bestimmte Zellarten oder Gewebe des Organismus entfalten.

Der Effekt des Urethans betrifft vor allem die Zellen einiger tumorartiger Erkrankungen der blutbildenden Gewebe, besonders die Zellen der Leukämie, und entspricht damit etwa demjenigen des Senfgases. Wie bei diesem kommt es auch beim Urethan fernerhin zu einer frühzeitigen und ausgeprägten Depression der Lymphopoese.

Manche trüben Erfahrungen bei der Leukämiebehandlung haben allerdings gelehrt, daß man beim Urethan nur bedingt von einer selektiv-cytostatischen Wirkung sprechen kann. Schon bei der üblichen Dosierung kommt es bisweilen zu einem Übergreifen der Wirkung auch auf andere Gewebe. Einer besonderen Gefahr scheinen vor allem das Knochenmark, die Leber und die Keimdrüsen ausgesetzt zu sein. Gleiche oder ähnliche Nebenwirkungen werden übrigens auch bei allen anderen Cytostatica, einschließlich der östrogenen Substanzen (Arnold, Hamperl, Holtz, Junkmann und Marx[4], Feuchtinger[5] u. a.) beobachtet. Neuerdings konnten auch beim Alloxan, das zunächst als streng selektiv wirksam gegolten hatte, toxische Zellschädigungen an verschiedenen Organen (Niere, Hoden usw.) festgestellt werden (Bargmanns und Creutzfeldt[6]).

Mag die Gefahr einer zusätzlichen Schädigung gesunder Gewebe gerade beim Urethan relativ groß sein, so kann doch an dem tatsächlichen Vorhandensein einer Selektivität der Wirkung wohl kaum ein Zweifel bestehen. Die Unterschiede in der Urethanempfindlichkeit der verschiedenen Körperzellen sind in der Regel sehr erheblich (Moeschlin[7] u. a.). An der Spitze stehen die Zellen der chronisch-myeloischen Leukämie und die Lymphocyten. Hochempfindlich auf Urethan reagieren ferner die Zellen einiger seltenerer Tumorerkrankungen (Retothelsarkomzellen u. a.) und mancher Formen des Lymphogranuloms. Erst in größerem Abstande folgen die übrigen Zellformen des Organismus. Nirgends haben wir die tatsächlich vorhandenen

Unterschiede deutlicher vor Augen als bei der Urethanbehandlung der chronisch-myeloischen Leukämien. Wenn wir hier Zellzahlen von mehreren 100000/mm³ steil abfallen, beim Erreichen normaler Leukocytenzahlen aber plötzlich haltmachen sehen, wenn hier riesige Milztumoren sich fast vollständig zurückbilden, die Erythropoese aber gleichzeitig zusätzliche regeneratorische Leistungen vollbringt, so können wir wohl nicht umhin, mit Heilmeyer[8], R. Schoen[9], Schulze[10], Linke und Mechelke[11], Lettré[12] u. a. von einer „selektiven" Zellwirkung zu sprechen.

Es taucht damit die Frage auf, wie es zu einer solchen selektiv-cytostatischen Wirkung des Urethans auf bestimmte Zellformen kommen kann. Allen Erörterungen darüber, auch denen, die den eigentlichen Wirkungsmechanismus des Urethans betreffen (Eingriff in bestimmte Fermentsysteme usw.), ist die grundsätzliche Frage vorauszuschicken: Besitzt das Urethan eine besondere Affinität zu gewissen Zellen, in denen es sich anreichert, und wirkt es dadurch selektiv-cytostatisch — oder aber ist dies nicht der Fall, und die spezifische Wirkung auf diese Zellen beruht auf deren besonderer Urethanüberempfindlichkeit? Die Beantwortung dieser Frage steht bis heute aus. Heilmeyer, Merk und Pirwitz[1] schreiben dazu: „Die Frage, ob bestimmte Zellen, wie die unreifen Formen der Leukocyten bei den Leukämien, eine besondere Affinität zum Urethan haben, d. h. es besonders anreichern, oder nur auf besondere Weise reagieren, muß offen bleiben". Wir haben deshalb für den Fall des Urethans (Äthylurethans) dahingehende Untersuchungen vorgenommen.

Festgestellt wurde die Verteilung des Urethans zwischen dem Blutplasma einerseits und den verschiedenen physiologischen und pathologischen Blutzellformen andererseits in In-vitro-Versuchen. Die Urethankonzentrationen wurden im Interesse exakter Ergebnisse höher gewählt, als wir sie im Verlaufe der Urethanbehandlung der Leukosen angetroffen haben, andererseits sollten sie die bei der Urethannarkose vorkommenden Konzentrationen nicht überschreiten. Wir verwendeten deshalb Konzentrationen von 80—100 mg%.

Untersuchungen an roten Blutkörperchen.

Eine bekannte Urethanmenge (1 cm³ einer 2%igen Urethanlösung in physiologischer NaCl) wurde einem bestimmten Volumen Plasma (20 cm³) zugesetzt und darin die quantitative Urethanbestimmung nach der von uns angegebenen Methode[14] ausgeführt. Der exakte Wert ergab sich aus der Differenz zwischen dem Mittelwert dreier Urethanbestimmungen und dem Mittelwert des dreifach bestimmten Blindwertes in 20 cm³ Plasma + 1 cm³ physiologischer Kochsalzlösung. Dieser Wert, den wir hier als *b* bezeichnen, entsprach stets weitgehend dem theoretisch zu erwartenden. Dieselbe Urethanmenge wurde dann einem gleichen Volumen Vollblut zugesetzt, dieses zentrifugiert und im überstehenden Plasma die Urethanbestimmung dreifach vorgenommen. Auch hier

wurden wieder drei Blindwerte (20 cm³ Vollblut + 1 cm³ physiologische NaCl zentrifugieren, Bestimmungen im überstehenden Plasma) festgelegt; aus der Differenz der Mittelwerte ergab sich der Wert a. Aus den Werten a und b ließ sich unter Berücksichtigung des Blutkörperchen-Volumens (bestimmt im Hämatokritröhrchen nach Hedin *nach* Zusatz der Urethanlösung) der Urethangehalt in den Erythrocyten selbst (c) errechnen nach der Formel:

$$c = \frac{b - (a \cdot \text{Plasmavolumen})}{\text{Blutkörperchenvolumen}}$$

Das Volumen der Leukocyten im normalen Blut ist so gering, daß es dabei vernachlässigt werden kann.

Zur Untersuchung kam das Blut von 4 gesunden Versuchspersonen und 2 Patienten mit Polycythämia vera. Die Ergebnisse für den Quotienten a/b und das Blutkörperchenvolumen, sowie für den sich aus diesen Werten ergebenden Verteilungsquotienten Blutplasma/Blutkörperchen $= a/c$ sind in der untenstehenden Tabelle aufgeführt (Nr. 1 bis 6.)

Tabelle 1.

Nr.	Zelltyp	$\frac{a}{b}$	Blutkörp. Vol.	$\frac{a}{c}$	Mittel
1	Erythrocyten d. normalen Blutes	1,03	0,44	1,07	
2	„ „ „	1,04	0,42	1,11	1,085
3	„ „ „	1,04	0,40	1,10	
4	„ „ „	1,02	0,41	1,06	
5	Erythrocyten einer Polycythämia vera	1,01	0,57	1,02	1,045
6	„ „ „ „	1,04	0,67	1,07	
7	Leukocyten d. normalen Blutes (Pferd)	1,03	0,45	1,06	
8	Leukocyten einer Pyriferleukocytose	1,01	0,41	1,02	1,053
9	Leukocyten einer hochgradigen lymph. Reaktion	1,04	0,46	1,08	
10	Leukocyten einer chron.-myel. Leukämie	1,03	0,40	1,08	
11	„ „ „ „	1,03	0,42	1,08	
12	„ „ „ „	1,04	0,45	1,09	
13	Leukocyten eines akuten Myeloblastenschubes	1,04	0,42	1,10	1,085
14	Leukocyten einer lymphat. Leukämie	1,04	0,49	1,08	
15	„ „ „ „	1,03	0,34	1,08	

Beikert: „Untersuchungen über die Affinität des Urethans . . . . . .“

Untersuchungen an weißen Blutkörperchen.

Im Prinzip war die Methodik die gleiche wie im Vorstehenden. An Stelle des Vollblutes wurden Gemische untersucht, die aus Plasma und Leukocyten etwa im Verhältnis 60 : 40 zusammengesetzt waren.

Zur Gewinnung der Leukocyten standen im Wesentlichen 2 Möglichkeiten zur Verfügung; einmal die Isolierung der Leukocyten durch mehrfaches Zentrifugieren

und Waschen nach vorheriger Hämolysierung des Blutes mit Essigsäure (Bauer[15]), zum anderen die Gewinnung durch Sedimentieren, schichtweises Abpipettieren und anschließendes fraktioniertes Zentrifugieren, wie es etwa von Wacker und Hueck[16] u. a. angegeben worden ist. Das letztere Verfahren dürfte das schonendere sein, da dabei keine Säure zugesetzt werden muß; wir haben deshalb stets mit dieser Methode gearbeitet, bis auf den Fall einer Pyriferleukocytose, bei dem wir wegen zu geringfügiger Senkungsgeschwindigkeit zu der Essigsäuremethode gegriffen haben.

Meist mußte mit 5 cm^3 Gemisch gearbeitet werden, dem 1 cm^3 einer 0,5%igen Urethanlösung zugesetzt wurde.

Der gewonnene Leukocytenbrei enthält außer den Leukocyten noch geringe Verunreinigungen durch Thrombocyten und Erythrocyten, die quantitativ aber kaum ins Gewicht fallen.

Die Gewinnung ausreichender Mengen von normalen Leukocyten war beim Menschen nicht ohne weiteres möglich. Wir haben deshalb zur Untersuchung der normalen weißen Blutkörperchen Pferdeleukocyten nehmen müssen, die aus etwa 10 l Pferdeblut gewonnen wurden.

Des weiteren wurden die Zellen einer Pyriferleukocytose (22600/mm^3) nach einem Aderlaß von 1000 cm^3 im Hämolyseverfahren isoliert und untersucht. Es handelte sich dabei um das Blut eines polycythämischen Mannes, bei dem ein so großer Aderlaß als eine therapeutische Maßnahme gelten konnte. Schließlich kam das Leukocytenkonzentrat eines Patienten mit hochgradiger lymphatischer Reaktion (bei miliarer, ad finem führender Tuberkulose) zur Untersuchung. Die Leukocytenzahl zur Zeit der Blutentnahme betrug 80000/mm^3, davon waren 85% lymphatische Zellelemente. Die Sektion bestätigte später die Diagnose „lymphatische Reaktion" und ergab keinen Anhalt für eine Leukämie.

Das Ergebnis dieser 3 Untersuchungen (Nr. 7—9 der Tabelle) zeigt uns das Verhalten des Urethans zu den normalen, d. h. hier nichtleukämischen weißen Blutkörperchen.

Wir haben diesen Untersuchungen die an Leukämieleukocyten erhobenen Befunde gegenübergestellt. Untersucht wurden die Leukocytenkonzentrate von 3 chronisch-myeloischen Leukämien mit Leukocytenzahlen zwischen 300000 und 400000/mm^3 (typischem Differential-Blutbild) und einem Myeloblastenschub bei chronisch-myeloischer Leukämie mit 48% Myeloblasten und 7% Promyelocyten im Ausstrich (Nr. 10 bis 13); ferner die Zellen der lymphatischen Leukämie in 2 Fällen (Nr. 14 und 15). Bei Nr. 14 bestand eine Gesamtleukocytenzahl von 120000 mit 86% Lymphocyten, bei Nr. 15 eine Zellzahl von 148000 mit 94% lymphatischen Elementen.

Besprechung der Ergebnisse.

Die Untersuchungen über die Verteilung des Äthylurethans zwischen dem Blutplasma einerseits und den verschiedensten Zellformen des Blutes andererseits ergaben übereinstimmend einen höheren Urethangehalt im Plasma, d. h. der Verteilungsquotient Blutplasma/Blutzellen (VQ) war stets >1. Das Plus zugunsten des Plasmas war nie sehr erheblich; der höchste Wert für den VQ betrug 1,11, während als niedrigster ein solcher von 1,02 gefunden wurde.

Als Mittelwert für den V Q ergab sich bei den Erythrocyten gesunder Versuchspersonen ein Wert von 1,085, bei den Erythrocyten der Polycythämie ein solcher von 1,045; bei den weißen Blutzellen steht ein Mittelwert von 1,053 für die Leukocyten nichtleukämischer Herkunft einer Zahl von 1,085 für die Leukämiezellen gegenüber.

Die Unterschiede zwischen den für die einzelnen Kategorien gewonnenen Ergebnissen sind also offensichtlich nur geringfügig und zum Teil durch die Fehlerbreite der Versuchsanordnung bedingt, wie auch die geringfügigen Schwankungen innerhalb der einzelnen Gruppen bezeugen. De facto dürfte hinsichtlich der Verteilung des Urethans auf Plasma und

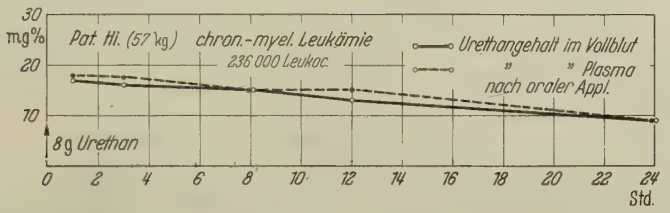


Abb. 1. Urethangehalt im Vollblut u. Plasma nach 8 g Urethan per os bei chron.-myel. Leukämie.

Zellen weder zwischen weißen und roten, noch zwischen physiologischen und pathologischen Zellformen des Blutes ein nennenswerter Unterschied vorhanden sein.

Die wesentlichste Frage, die auch zu diesen Untersuchungen Anlaß gegeben hatte, ließ sich in ganz einwandfreier Weise beantworten: eine selektive Affinität des Urethans zu denjenigen Blutzellen, die am stärksten „cytostatisch" beeinflußt werden (Leukämiezellen, Lymphocyten) besteht sicher nicht; auch das untersuchte Myeloblastenblut ließ eine solche nicht erkennen. Der festgestellte Urethangehalt in den Leukämiezellen und Lymphocyten war — innerhalb der Schwankungsbreite der für alle Zelltypen gewonnenen Ergebnisse — sogar verhältnismäßig niedrig.

Die hier gefundene Tatsache, daß eine besondere Affinität des Urethans zu den Leukämiezellen nicht vorhanden ist, steht in Übereinstimmung mit Untersuchungsergebnissen, die wir durch direkte Bestimmungen des Urethangehalts im Plasma und Vollblut von mit Urethan belasteten Leukämiepatienten erhielten. Hier fanden wir nur ganz geringfügige Unterschiede zwischen den Plasma- und Vollblutwerten zugunsten des Plasmas (siehe Abbildung), ganz wie wir es auch bei gesunden Versuchspersonen nachweisen konnten. Auch die absolute Höhe des nach einer bestimmten Dosis auftretenden Urethanblutspiegels der Leukämiker entsprach völlig dem gleichschwerer gesunder Versuchs-

personen. Bei einer besonderen Affinität des Urethans zu den Zellen der pathologisch entgleisten Myelopoese hätte man wahrscheinlich auch hier Unterschiede gegenüber gesunden Individuen erwarten können.

Zusammenfassung.

Es wurde untersucht, ob sich die selektiv-cytostatische Wirkung des Urethans auf bestimmte Blutzellen, wie Lymphocyten und Leukämiezellen durch eine besondere Affinität des Mittels zu diesen Zellen im Sinne einer selektiven Anreicherung erklären läßt. Bei in vitro-Versuchen konnte ein höherer Urethangehalt in den Lymphocyten und Leukämiezellen im Vergleich zu anderen Blutzellen nicht festgestellt werden. Die Spezifität der cytostatischen Wirkung des Urethans kann deshalb nur durch die Annahme einer besonderen Empfindlichkeit der auf das Mittel ansprechenden Zellen erklärt werden.

Literatur.

[1] Heilmeyer, Merk u. Pirwitz: „Klinik und Pharmakologie des Urethans und anderer cytostatischer Stoffe". Beihefte zur Med. Monatsschr. 1948. — [2] Dunn: Lancet **244**, 482 (1943). — [4] Arnold, Hämperl, Holtz, Junkmann u. Marx: Arch. exp. Path. u. Pharm. **186**, 1 (1937). — [5] Feuchtinger: Med. Klinik **1948**, 1 u. 45. — [6] Barg-manns u. Creutzfeldt: Kli. Wo. **1949**, 268. — [7] Moeschlin: Schweiz. Med. Wo. **40**, 976 (1948). — [8] Heilmeyer: Med. Klinik **1947**, 182, 627 u. 874. — [9] Schoen, R.: Klin. Wschr. **1947**, 488. — [10] Schulze: D. M. W. **1947**, 72, 153, 267. — [11] Linkl u. Mechelke: Med. Klinik **1948**, 570. — [12] Lettré: Z. Krebsf. **56**, 197 (1949). — [13] Forssmann: Wiss. Woche zu Frankfurt a. M., 2.—9. Sept. 1943 und Acta path. et microbiol. scand. 1931. — [14] Beickert: Arch. exp. Path. u. Pharm. (im Druck) — [15] Bauer: Z. klin. Med. **105**, 708 (1927). — [16] Wacker u. Hueck: Arch. exp. Path. u. Pharm. **74**, 423 (1913).

Dr. med. Albrecht Beickert, Jena/Th., Medizin. Univ.-Klinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 210, S. 479—484 (1950).

Aus der Medizinischen Univ.-Klinik Jena (Direktor: Prof. Dr. med. W. Brednow).

Eine Methode zum quantitativen Nachweis von Aethylurethan in Körperflüssigkeiten.

Von

Albrecht Beickert.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 23. November 1949).

Bemühungen um eine Nachweismethode für Äthylurethan in biologischen Flüssigkeiten sind bereits im Jahre 1886 festzustellen, ein Jahr, nachdem Schmiedeberg[1] das Urethan als Schlafmittel in die Medizin eingeführt hatte.

Damals gab Jacquemin[2] bekannt, daß es möglich sei, in Ätherausschüttelungen des Harns von Personen, die Urethan eingenommen hatten, mit Kalilauge und Sublimat weiße gelatinöse Niederschläge von Quecksilbercarbamat auszufällen. Mulder[3] fand später, daß der entstehende Niederschlag nicht aus Quecksilbercarbamat, sondern aus der Quecksilber-Urethan-Verbindung $HgN\text{-}CO\text{-}OCH_2\text{-}CH_3$ bestand. Praktische Bedeutung gewann jedoch diese Reaktion nur für den Apotheker, der sie gelegentlich zur Identifizierung von Urethan benutzte.

Zur Ausarbeitung einer quantitativen Bestimmungsmethode für Äthylurethan ist es in der Folge nicht gekommen, offenbar deswegen, weil das wenigstens in der praktischen Medizin sich nicht recht durchsetzende Urethan rasch an Interesse verlor. So sind viele die Urethananwendung betreffende pharmakologische Fragestellungen bis zum heutigen Tage ungeklärt geblieben.

Über Resorption, Verteilung im Organismus, Abbau und Ausscheidung des Urethans ist so gut wie nichts bekannt. Stärker bemerkbar machen sich diese Mängel aber erst in den letzten Jahren, seitdem durch die Arbeiten von Haddow und Sexton[4] und Paterson, Haddow, Thomas und Watkinson[5] das Urethan in die Tumor- und Leukämiebehandlung erfolgreich eingeführt worden ist. Eine quantitative Nachweismethode für Urethan in biologischen Flüssigkeiten, als Voraussetzung für die Erforschung des Schicksals des Urethans im Organismus, dürfte heute, wo das Urethan wieder in großem Maßstabe therapeutische Verwendung findet, allgemeines Interesse besitzen.

Wir hatten unser Augenmerk zuerst auf die Jacqueminsche Methode gerichtet, mußten aber einsehen, daß es unmöglich ist, aus ihr eine brauchbare quantitative Methode zu entwickeln. Wegen der benötigten großen Mengen an Ausgangsmaterial (500 cm^3) ist sie darüber hinaus nur für den Urin geeignet. Auch die von Heilmeyer, Merk und Pirwitz[6] erwähnte Möglichkeit, das Urethan durch Schwefelsäure zu spalten und die Mikroanalyse nach Kjeldahl anzuschließen, schaltet für Untersuchungen in Körpersäften von vornherein aus, da es nicht gelingen dürfte, das Urethan von anderen stickstoffhaltigen Substanzen vollständig zu trennen. Daß die von Genot[7] beschriebenen Versuche mit spezifischen Farbreaktionen des Urethans einmal Bedeutung für Untersuchungen in biologischen Flüssigkeiten erlangen werden, erscheint uns ebenso fragwürdig.

Ziel war, eine Methode in die Hand zu bekommen, mit der der Urethannachweis in möglichst allen Körpersäften, vor allem aber im Blut, und zwar quantitativ, gelingt. Darüber hinaus erschien wünschenswert eine Mikromethode, die es gestattete, in nicht zu großen Mengen der zu untersuchenden biologischen Materialien, daher auch häufigere Bestimmungen auszuführen.

Beschreibung der Methode.

Prinzip: Der in Urethan veresterte Äthylalkohol wird in Freiheit gesetzt und als solcher nach der WIDMARKschen Methode quantitativ bestimmt.

Reagentien: 1. Kaliumbichromat-Schwefelsäurelösung:
0,075 $K_2Cr_2O_7$ in 1—2 cm³ Aqua dest. lösen und mit reinster konz. H_2SO_4 auf 200 cm³ auffüllen.

2. Natronlauge:
24 g NaOH auf 100 cm³ Aqu. dest.

3. Kaliumjodidlösung:
5 g jodatfreies KJ auf 100 cm³ Aqu. dest.

4. 1%ige Stärkelösung in gesättigter NaCl-Lösung.

5. n/200 Natriumthiosulfatlösung.

Geräte: Spezialkölbchen, die sich von den von WIDMARK zur Blutalkoholbestimmung angegebenen dadurch unterscheiden, daß die am Schliffstopfen befestigten Näpfchen etwa 0,6 cm³ fassen, mehr breit als hoch sein und einen halbrunden Boden besitzen sollen, und daß ferner auf dem Stopfengriff eine Glasmuffe mit flachviereckigem Lumen befestigt ist (siehe Skizze); an letzterer können die Schliffstopfen auf flache Metallstäbe aufgezogen werden, wodurch eine starre Befestigungsmöglichkeit gegeben ist, die eine ungestörte Durchmischung des Näpfcheninhaltes gewährleistet. Alle übrigen Geräte wie bei der Alkoholbestimmung nach WIDMARK[8].

Arbeitsgang: Die zu untersuchenden Körperflüssigkeiten können in verschließbaren Gläschen mehrere Tage lang im Eisschrank aufbewahrt werden, wobei sich das Urethan nicht zersetzt; Urin wird bei alkalischer Reaktion vorher angesäuert. Von jeder Materialprobe werden 3 Bestimmungen angesetzt. Bei Belastungsversuchen sind die verschiedenen Materialproben gleichzeitig und zusammen mit den Blindwerten (siehe unten) zu verarbeiten.

Die Schliffstopfen der Spezialkölbchen mit den daran befestigten Näpfchen werden in ihren Haltevorrichtungen aufgereiht und die Näpfchen zunächst mit je 0,1 cm³ Aqua dest. beschickt. Anschließend wird je 0,1 cm³ der zu untersuchenden Flüssigkeit eingefüllt.

Plasma, Serum, Urin, Liquor, wäßrige Urethanlösung usw. können auch ohne Wasserverdünnung eingefüllt werden, man nimmt dann 0,2 cm³ und dividiert bei der Berechnung durch 2; bei Bestimmungen im Erythrocytenbrei erwies es sich als zweckmäßig, nur 0,05—0,10 cm³ zu untersuchen und diese in 0,25—0,30 cm³ Aqua dest. im Näpfchen selbst zu hämolysieren. Der Inhalt wird durch Blasen mit einem dünnen

Gummischlauch gut vermischt. Jetzt füllt man erst in jedes der 50 cm³-Kölbchen je 1,50 cm³ der Bichromatschwefelsäurelösung mittels einer Einmeßvorrichtung, wie sie bei Alkoholbestimmungen zur Verwendung kommt. Von diesem Zeitpunkt ab bis zum Abschluß der Titration ist unter Ausschluß des Tageslichtes zu arbeiten.

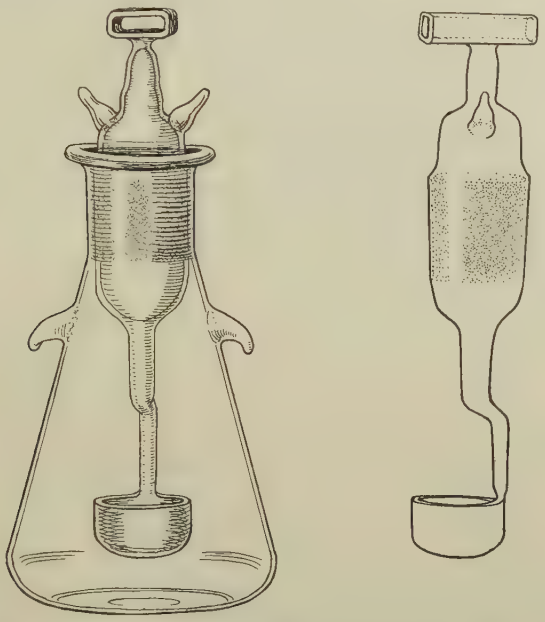


Abb. 1. Modifizierte WIDMARK-Kölbchen zu Urethanbestimmungen.

Als nächstes werden die Näpfchen fertiggemacht. Zu dem bereits vorhandenen Inhalt kommt 0,1 cm³ der Natronlauge, das Ganze wird durch Blasen nochmals gut durchmischt, dann der Schliffstopfen vom Metallstab abgezogen und in den Kölbchenhals fest eingedreht. Der weitere Arbeitsgang (Destillation und Titration) ist ganz der gleiche wie bei der WIDMARK-Methode [8, 9, 10]. Das Herausnehmen der Kölbchen aus dem Thermostaten hat bei Urethanbestimmungen stets gleichzeitig zu erfolgen.

Berechnung: Aus den 3fach-Bestimmungen werden die Mittelwerte genommen und die Differenz zwischen Vollversuchen und Blindwerten festgestellt. Dann errechnet sich bei Verwendung von 0,1 cm³ Untersuchungsflüssigkeit der Urethangehalt nach der Formel:

$$\frac{\text{mm}^3 \cdot \frac{n}{100} \cdot \text{Na-Thiosulfat} \times \text{Fakt.}_{\text{Thiosulfat}} \times \text{Äquivalentgew.}_{\text{Urethan}} \cdot (22{,}27)}{100} = \text{mg\%}_{\text{Urethan}}$$

Besprechung der Methode.

Einzelheiten wären nur zu besprechen, soweit sie Abweichungen von der WIDMARK-Methode betreffen.

a) Zur Abspaltung des Alkohols aus dem Urethan erwies sich Natronlauge als bestgeeignet. Urethan wird dabei nicht durch einfache Esterspaltung in Alkohol und Na-carbaminat zersetzt, sondern offenbar unter Bildung von Zwischenverbindungen in Alkohol und Na-carbonat, teilweise wohl auch in Alkohol und Na-isocyanat (MULDER[3], AESCHLIMANN und REINERT[11], STEDMANN und STEDMANN[12]. Wesentlich ist, daß als Endprodukt aller möglichen Reaktionen aus je einem Mol. Urethan ein Mol. Äthylalkohol hervorgeht.

b) Die Aufspaltung des Urethans erfolgt in der von uns angegebenen Weise — gleichgültig, ob sich das Urethan in Wasser oder in biologischen Flüssigkeiten gelöst befindet — annähernd quantitativ, wofür folgende Belege angeführt seien:

1. Urethan in Wasser gelöst.

Urethanversuche

($0{,}1\ \frac{m}{16}$ Urethan + H_2O + 0,1 NaOH)	$cm^3\ \frac{n}{100}$ Natriumthiosulfat
I	2,50
II	2,51
III	2,48

Leerversuche

($0{,}2\ H_2O$ + 0,1 NaOH)	
I	5,02
II	5,03
III	5,03

Die Mittelwertdifferenz zwischen Leer- und Vollversuchen = 2,53 cm^3 0,01 n Na-Thiosulfat mit dem Faktor 0,9844 ergibt:

	mg Äthylalkohol	*mg Urethan*
gefunden	0,2838	0,5546 = 99,6%
eingefüllt	0,2850	0,5567

2. Urethan in Blut gelöst.

Urethanversuche

($0{,}1\ \frac{m}{16}$ Urethan + 0,1 Blut + 0,1 NaOH)	$cm^3\ \frac{n}{100}$ Natriumthiosulfat
I	2,45
II	2,49
III	2,46

Leerversuche

($0{,}1\ H_2O$ + 0,1 Blut + 0,1 NaOH)	
I	4,94
II	4,95
III	4,94

Aus der Differenz 2,47 cm^3 0,01 n Na-Thiosulfat errechnet sich:

gefunden	0,5413 mg Urethan = 97,2%
eingefüllt	0,5567 mg Urethan.

c) Die hygroskopischen Eigenschaften des Natriumhydroxyds bewirken, daß der Näpfcheninhalt nach 2stündiger Destillation über konz. Schwefelsäure nicht vollständig eingetrocknet ist wie bei der Original-Widmark-Methode, auch dann nicht, wenn — wie das bei uns geschieht — als Vorlage 50% mehr Schwefelsäure (1,50 cm^3 mit entsprechend niedrigerer Bichromatkonzentration) zur Verwendung kommt als bei der Widmark-Methode. Eine Beeinträchtigung der Ergebnisse entsteht dadurch nicht, da der Alkohol schon nach Abdampfen von etwa ein Fünftel der Gesamtflüssigkeit praktisch quantitativ ins Destillat übergegangen ist.

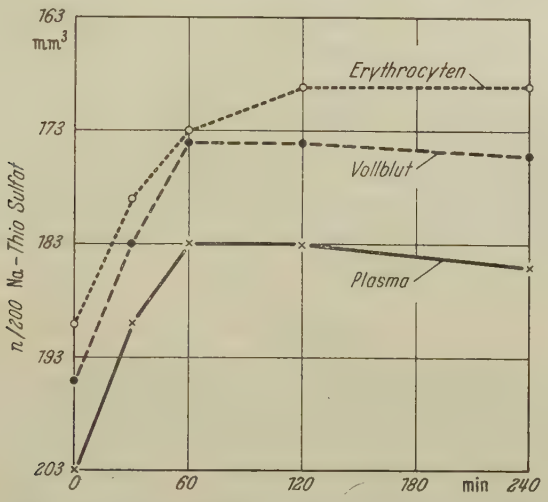


Abb. 2. Gleichzeitige Urethanbestimmungen im Plasma, Vollblut u. hämolysierten Erythrocyten nach Belastung einer Versuchsperson mit 10 g Urethan per os. Der Blindwert liegt am höchsten im dichtesten Material, den Erythrocyten, am niedrigsten im Plasma.

d) Gibt man Natronlauge zu normalen, nicht urethanhaltigen biologischen Flüssigkeiten hinzu, so bilden sich regelmäßig geringe Mengen wahrscheinlich stickstoffhaltiger reduzierender Substanzen, die wie der Alkohol flüchtig sind und bei der Bestimmungsmethode nach Widmark Alkohol vortäuschen können. Solche Substanzen bilden sich auch im enteiweißten Serum und im Urin. Die durch die genannten Stoffe verursachten Reduktionen müssen bei der Berechnung einkalkuliert werden. Dies geschieht durch die Bestimmung eines Blindwertes (Näpfchenfüllung mit 0,1 Aqua dest. + 0,1 Blut, Urin usw. . . . *ohne* Urethan bzw. *vor* Urethangabe + 0,1 Natronlauge), von dem der Wert des Vollversuches abgezogen wird. Der Blindwert ist, wie uns Versuche gezeigt haben, bei ein und derselben Person in derselben Körperflüssigkeit etwas sehr konstantes, auch über größere Zeiträume hin. Dagegen sind die Blindwerte in heterologen Körperflüssigkeiten verschieden, müssen also gesondert bestimmt werden (siehe Abbildung 2). Ungünstig liegen die Verhältnisse im Harn, dessen Zusammensetzung außerordentlich variiert. Doch lassen sich unter bestimmten Voraussetzungen (Einkalkulierung des spez. Gewichtes, indifferenter Kost usw.) auch im Harn recht exakte quantitative Urethanbestimmungen vornehmen (Näheres von Interessenten beim Verf. direkt zu erfragen). Die an sich naheliegende Befürchtung, daß bei Urethanbestimmungen in Belastungsversuchen der bei der Entgiftung des Urethanmoleküls im Organismus

eventuell auftretende Alkohol, der bei unserer Methode miterfaßt wird, zu Fehlschlüssen verleiten könnte, hat sich als unzutreffend erwiesen; auch nach hohen Urethandosen tritt weder im Blut noch im Urin eine nach der Widmark-Methode meßbare Vermehrung des Gehaltes an freien Äthylalkohol auf.

Die Brauchbarkeit der geschilderten Urethanbestimmungsmethode wurde in bereits über 2000 Einzelbestimmungen erprobt und bestätigt gefunden. Ihr wichtigster Vorzug ist ihre hohe Empfindlichkeit, die es ermöglicht, die Bestimmungen in sehr kleinen Materialproben auszuführen. ½—1 γ Urethan kann titrimetrisch noch festgehalten werden, dies entspricht bei Untersuchungen in 0,2 cm³ Blut, Serum usw. ½ mg%, bei Untersuchungen in 0,1 cm³ 1 mg%. Somit können Urethankonzentrationen, wie sie nach therapeutischen Dosen in den Körpersäften zu erwarten sind, noch ohne weiteres erfaßt werden. Exakte quantitative Ergebnisse konnten bei Belastungsversuchen mit 6—12 g Urethan pro Versuchsperson, bei Tier- und In-vitro-Versuchen erzielt werden.

Der mittlere Fehler beträgt nach unseren Erfahrungen bei Übung etwa $\pm$ 3 mg% für die Einzelbestimmung.

Zusammenfassung.

Es wird eine neue quantitative Bestimmungsmethode für Äthylurethan in biologischen Flüssigkeiten mitgeteilt und besprochen. Diese ist als Mikro-Methode entwickelt und beruht auf dem Nachweis des im Urethan veresterten Äthylalkohols nach der Widmark-Methode nach vorausgegangener Abspaltung des Alkohols mittels Natronlauge. Die Methode eignet sich in erster Linie für den quantitativen Urethannachweis im Vollblut, Plasma, Serum, Liquor und anderen konstant zusammengesetzten Körperflüssigkeiten.

Literatur.

[1] Schmiedeberg: Arch. exp. Path. u. Pharm. **20**, 206 (1885). — [2] Jacquemin: Bull. Soc. chimique de Paris **46**, 306 (1886). — [3] Mulder: Recueil d. Trav. chimique d. Pays-Bas **4**, 169 (1889). — [4] Haddow and Sexton: Nature **157**, 500 (1946). — [5] Paterson, Haddow, Thomas and Watkinson: Lancet **1946**, I, S. 677. — [6] Heilmeyer, Merk u. Pirwitz: Klinik und Pharmakologie des Urethans. Beihefte zur Med. Monatsschr. Stuttgart: Wissensch. Verlagsges. 1948. — [7] Genot: J. pharmac. Belgique **9**, 245 (1927). — [8] Widmark: Die theoret. Grundlagen und prakt. Verwertbarkeit der gerichtl.-medizin. Alkoholbestimmung. Urban & Schwarzenberg 1932. — [9] Jungmichel: Alkoholbestimmung im Blut. Berlin 1933. — [10] Elbel-Die wissenschaftl. Grundlagen der Beurteilung von Blutalkoholbefunden. Leipzig: Thieme 1937. — [11] Aeschlimann u. Reinert: J. Pharm. Exp. Therap. **43**, 413: (1931). — [12] Stedmann and Stedmann: Biochem. Journ. **26**, II, 1214 (1932). —

Dr. med. Albrecht Beickert, Jena/Th., Medizin. Univ.-Klinik.

COUNTWAY LIBRARY
HC 6EBL

41B212+

J. HOLZER
BINDER
BOSTON, MASS.